SERIE : B

N° D'ORDRE : 22

N° DE SERIE : II

THESE

présentée

devant L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. STRUCTURE ET PROPRIETES DE LA MATIERE

pour obtenir

Le titre de Docteur de l'Université

Spécialité : PHYSIQUE MOLECULAIRE

par

René MERMET-BOUVIER

Contribution à l'étude des isomérisations photochimiques de l'ergostérol.

Soutenue le 28 Juin 1972 devant la Commission d'Examen

M. M. VACHER	Professeur à l'Université de Rennes	Président
M. A. FOUCAUD	Professeur à l'Université de Rennes	Examinateur
M. P. DELATTRE	Chef du Groupe d'Études des effets des Rayonnements sur les structures moléculaires	Membre invité

SÉRIE : B
N° D'ORDRE : 22
N° DE SÉRIE : 11

THESE

présentée

devant L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. STRUCTURE ET PROPRIETES DE LA MATIERE

pour obtenir

Le titre de Docteur de l'Université

Spécialité : PHYSIQUE MOLECULAIRE

par

René MERMET-BOUVIER

Contribution à l'étude des isomérisations photochimiques de l'ergostérol.

Soutenue le 28 Juin 1972 devant la Commission d'Examen

M. M. VACHER	Professeur à l'Université de Rennes	Président
M. A. FOUCAUD	Professeur à l'Université de Rennes	Examinateur
M. P. DELATTRE	Chef du Groupe d'Études des effets des Rayonnements sur les structures moléculaires	Membre invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UN IVERSITE DE RENNES

U.E.R. issues de la FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

M. MILON Y.
M. TREHIN R.
M. SCHMITT M.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.

Professeurs Honoraires

M. ANTOINE L.
M. FREYMANN R.
M. HAGENE P.
M. POISSON R.
M. ROHMER R.
M. TREHIN R.
M. SALMON-LEGAGNEUR F.
M. des ABBAYES H.
M. MILON Y.

Maîtres de Conférences Honoraires

M. GRILLET L.
M. LECRECQ A.

Mathématiques

Professeurs

Melle CHARPENTIER M.
M. GUERINDON J.
M. METIVIER M.
M. GIORGIUTTI I.
M. BRUNEL A.
M. TOUGERON J.C.

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

M. LEGOUPIL J.
M. HOUDEBINE J.
M. EUVRARD D.
M. LIEUTAUD M.
M. NEDELEC J.C.
M. VERJUS J.P.
M. TRILLING L.

Physique

M. VACHER M.
M. VIGNERON L.
M. LE BOT J.
Mme ROBIN née SALOMOND
M. ROBIN S.
M. LE MONTAGNER S.
M. MEVEL J.Y.
M. MEINNEL J.
M. REGENSTREIF E.
M. BRUN P.
M. LE ROUX E.
M. DUBOST
M. GUIDINI
M. HAEUSLER C.
M. ARQUES P.Y.
M. DECAMPS E.
M. NUSIMOVICI M.A.

Chimie

M. VENE J.
M. LEVAS E.
M. PELTIER D.
M. PRIGENT J.
M. JOUAN P.
M. FOUCAUD A.
M. LANG J.
M. CARRIER R.
M. GUERILLOT C.
M. KERFANTO M.
M. DABARD R.
M. GRANDJEAN D.
M. LUCAS J.
M. DUVAL J.
M. TALLEC A.

Zoologie

M. RICHARD G.
M. MAILLET P.
M. BOISTEL J.
M. RAZET P.
M. FOLLIOT R.
M. ALLEGRET P.
M. MANIEY J.
M. JOLY J.
M. POSTEL (Professeur associé)
M. LEFEUVRE J.C.

Botanique

M. VILLERET S.
M. CLAUSTRES G.
Melle GOAS M.
M. MAGNE F.
Melle GOAS G.
Mme LEMOINE C.

Géologie

M. COGNE J.
Melle DURAND S.
M. PHILIPPOT A.
M. BOILLOT G.
M. HAMEURT J.

Le Conseiller Administratif des Services Universitaires

M. R. BOURDIGUEL

A mes Parents

A ma Femme

A mon Fils

Monsieur le Professeur Michel Vacher m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma très respectueuse reconnaissance pour les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués.

Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et de mon sincère attachement.

Que Monsieur le Professeur A. Foucaud qui a bien voulu s'intéresser à mon travail et qui m'a fait l'honneur de siéger à mon jury de thèse trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je témoigne toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance à Monsieur Delattre, qui me dirige depuis quinze années, pour m'avoir initié à la recherche scientifique.

J'adresse tous mes remerciements à tous mes camarades qui m'ont aidé au cours de ce travail. Et je prie tout particulièrement Monsieur C. Hyver et Monsieur G. Naudet pour leur collaboration efficace, de trouver ici un témoignage de bien sincère amitié. Je remercie également Madame Lacoste pour la réalisation matérielle de ce mémoire. Qu'elle veuille bien croire aux sentiments profonds d'amitié et de sympathie, forgés par des années de travail en commun, que je lui porte.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1. - SCHEMAS REACTIONNELS PHOTOCHIMIQUES ANTERIEURS 3

1.1. - Travaux de A. Windaus 3

1.2. - Travaux de L. Velluz 3

1.3. - Travaux de E. Havinga 4

CHAPITRE 2. - METHODES UTILISEES PAR LES AUTEURS PRECEDENTS POUR LA RECHERCHE DU SCHEMA REACTIONNEL 9

2.1. - Principe des études antérieures 9

2.2. - Principe des méthodes de séparation et de dosage des isomères 11

2.2.1. - Ergostérol 11

2.2.2. - Prévitamine 11

2.2.3. - Lumistérol$_2$ 12

2.2.4. - Tachystérol$_2$ 12

CHAPITRE 3. - DESCRIPTION DE LA METHODE UTILISEE DANS LA PRESENTE ETUDE 13

3.1. - Principe 13

3.2. - Partie théorique 14

3.2.1. - Emprunts à la théorie générale de l'évolution des systèmes moléculaires proposée par P. Delattre 14

3.2.2. - Formalisme utilisé - Cas général linéaire et non linéaire 18

3.2.3. - Etude analytique d'un système moléculaire linéaire 25

3.2.4.- Utilisation de deux méthodes permettant de lever l'ambiguité entre les trois derniers schémas réactionnels donnés dans la littérature 33

3.2.4.a.- Valeur propre minimum λ_m 33

3.2.4.b.- Vecteur propre correspondant à λ_m 35

3.3.- Partie expérimentale - Séparation et dosage des isomères 38

3.3.1.- Techniques d'irradiation 38

3.3.2.- Méthodes utilisées pour la séparation des isomères photochimiques - Insuffisance des méthodes décrites en 2.2. 41

3.3.2.a.- Chromatographie sur couche mince 43

3.3.2.b.- Chromatographie sur colonne ... 53

3.3.2.c.- Chromatographie en phase gazeuse 66

3.3.3.- Précautions expérimentales - Vérification de la pureté de chaque isomère - Mesure du rayonnement ultraviolet 77

3.3.4.- Purification de l'Ergostérol 83

3.3.5.- Spectrophotométrie Ultraviolette 87

3.3.6.- Spectrophotométrie Infrarouge 91

3.3.7.- Méthode d'analyse quantitative utilisée 95

CHAPITRE 4.- SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS 99

4.1.- Tracé des courbes d'évolution des différents isomères 103

4.2.- Schéma réactionnel le plus probable 105

CHAPITRE 5.- CONCLUSION 112

ANNEXE 1.- Séparation des Suprastérols (I et II) et de la Vitamine D_2 115

ANNEXE 2.- Photochimie de la Vitamine D_2 120
Mise en évidence de nouveaux isomères

ANNEXE 3.- Programme Fortran utilisé dans les calculs de la valeur propre minimum λ_m et des compositions relatives 130

BIBLIOGRAPHIE 134

INTRODUCTION. -

Il subsiste encore, malgré des travaux considérables effectués depuis 1932, certaines ambiguités dans la connaissance du schéma réactionnel d'isomérisation photochimique de l'ergostérol en vitamine D_2.

Les travaux expérimentaux précédents, effectués pour l'analyse qualitative ou quantitative des isomères photochimiques, étaient fondés sur la méthode analytique consistant à séparer les divers isomères, puis à les irradier séparément afin d'observer les produits auxquels ils donnaient alors naissance. A partir de ces observations, on s'efforçait de reconstituer par approximations successives, les transformations possibles (directes ou indirectes) entre les différents isomères. Mais cette méthode s'avère en définitive d'une mise en oeuvre délicate comme nous le verrons au paragraphe II. 1.

Trois schémas réactionnels possibles restent en compétition.

Nous avons, dans la présente étude, utilisé une nouvelle méthode théorique (1), qui apporte une grande simplification dans l'étude des systèmes moléculaires soumis à un rayonnement. Cette méthode, plus synthétique que les méthodes précédentes, a permis de montrer que les trois schémas réactionnels possibles sont pratiquement équivalents dans certains domaines expérimentaux, alors qu'ils diffèrent très sensiblement dans d'autres domaines.

Le protocole expérimental nécessaire pour déterminer le schéma réactionnel réel a pu être ainsi défini avec précision.

Un schéma réactionnel photochimique a donc été élaboré à partir de certaines propriétés du régime permanent d'évolution (1), et par l'irradiation d'un seul isomère, l'ergostérol, contrairement aux travaux précédents.

Il a été nécessaire, pour aboutir au résultat définitif, de mettre au point des techniques nouvelles de séparation et de dosage, applicables aux différentes espèces moléculaires du système ergostérol - vitamine D_2.

1. - SCHEMAS REACTIONNELS PHOTOCHIMIQUES ANTERIEURS. -

1.1. - TRAVAUX DE A. WINDAUS ET COLL. (2). -

Après que l'ergostérol fut isolé de l'ergot de seigle par Tanret, en 1889, et son effet vitaminiquê découvert en 1927, il a fallu attendre cinq années pour que A. Windaus et ses collaborateurs de l'Université de Göttingen proposent un premier schéma réactionnel :

$$\text{Ergostérol} \xrightarrow{h\nu} \text{Lumistérol}_2 \xrightarrow{h\nu} \text{Tachystérol}_2 \xrightarrow{h\nu} \text{Vitamine } D_2 \xrightarrow{h\nu} \text{Suprastérols}$$

Ce schéma est accepté jusqu'à ce que L. Velluz et ses collaborateurs, en 1948, mettent en évidence un nouvel isomère, la prévitamine.

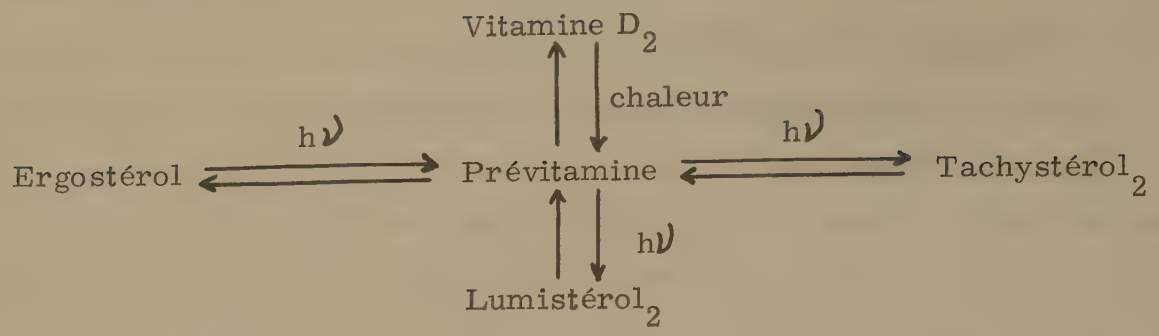
1.2. - TRAVAUX DE L. VELLUZ ET COLL. (3). -

L. Velluz observe que la teneur en vitamine D_2 de solutions récentes d'ergostérol irradié augmente en fonction du temps, même en l'absence de rayonnement.

Par estérification du mélange irradié, avec le chlorure de dinitro - 3,5 - benzoyle en présence de pyridine, à une température inférieure à 20°C, il obtient le dinitrobenzoate de précalciférol (ou prévitamine).

L. Velluz a effectué de nombreux travaux portant sur la structure du nouvel isomère, sur sa transformation purement thermique, et d'ailleurs réversible, en vitamine D_2 (qui s'effectue à des températures supérieures ou égales à 20°C), sur la détermination des constantes thermiques d'équilibre entre ces espèces ; il a mis en évidence la réversibilité des transformations photochimiques de l'ergostérol. En 1955, il propose un second

schéma réactionnel :



1.3.- TRAVAUX DE E. HAVINGA ET COLL. (4) (5) (7) (9).-

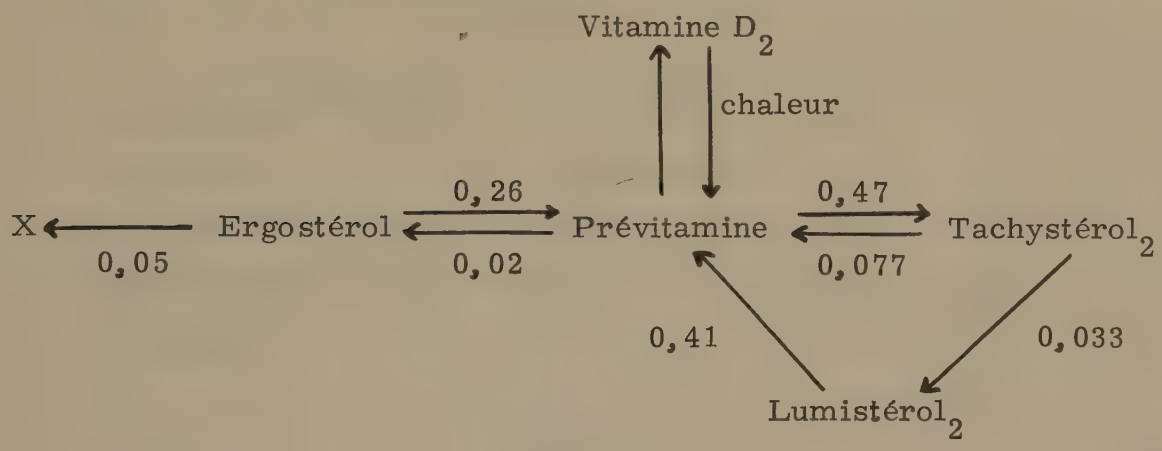
Des recherches très poussées ont été effectuées à l'Université de Leyde, en Hollande, sous la direction du Professeur E. Havinga.

Dès 1955, en même temps que L. Velluz (3), Koëvoet, Verloop et Havinga (5) élucidèrent la structure de la prévitamine qui fut alors identifiée comme étant l'isomère 6, 7 - cis - du tachystérol, auquel Inhoffen (6) attribua, en 1954, la configuration trans.

Par irradiation d'un mélange d'ergostérol marqué au Carbone - 14 et de lumistérol non marqué, Havinga, Koëvoet et Verloop (7), également en 1955, prouvèrent que le schéma, encore classique de Windaus, ne correspondait pas à leurs résultats expérimentaux. Ils conclurent effectivement que ni le lumistérol, ni le tachystérol ne sont des produits essentiels sur le chemin réactionnel conduisant de l'ergostérol à la vitamine D_2.

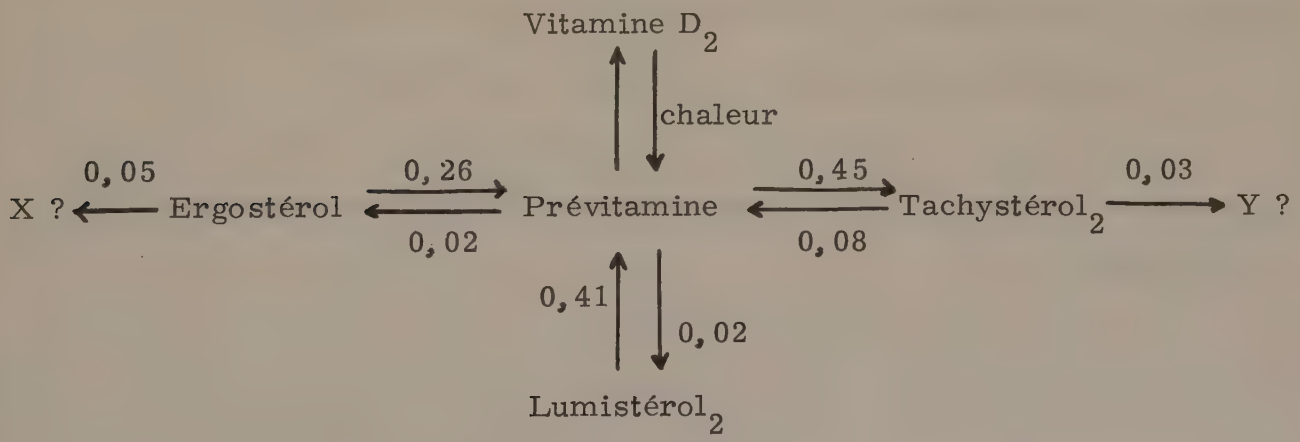
M. P. Rappoldt (8) étudia alors la composition, en fonction du temps d'irradiation, des mélanges irradiés. Il utilisa comme produit initial, non seulement l'ergostérol, mais également chacun des trois autres isomères.

Déterminant, de plus, les rendements quantiques des différentes transformations photochimiques, il propose, en 1958, un troisième schéma :



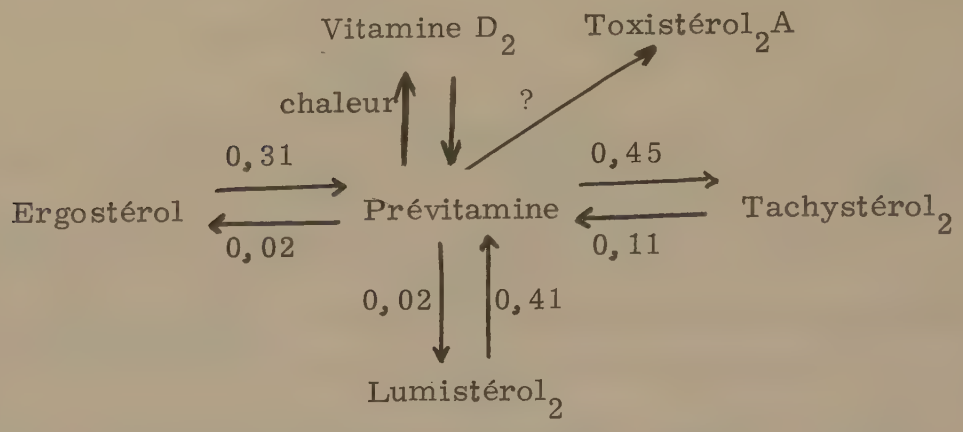
Les valeurs des rendements quantiques sont indiquées sur ce schéma.

En 1964, G.M. Sanders et E. Havinga (9), analysant, par radiochimie et chromatographie en couche mince, les différents corps primaires obtenus par photochimie de la prévitamine et du tachystérol$_2$, montrent que le lumistérol$_2$ ne s'insère pas entre ces deux derniers corps, comme l'a proposé M. P. Rappoldt dans le schéma ci-dessus, mais que leurs résultats expérimentaux peuvent se résumer dans un schéma identique à celui proposé par L. Velluz, mais dont ils précisent certaines données :



Les valeurs des rendements quantiques sont indiquées sur ce schéma.

Enfin, en 1967, G. M. Sanders (10) propose le schéma réactionnel le plus récent :



Les différentes espèces, isomères de l'ergostérol, ont leurs formules développées données dans la figure 1.

La numérotation des atomes de carbone, dans ces formules développées est identique à la numérotation utilisée pour les stéroïdes (figure 2).

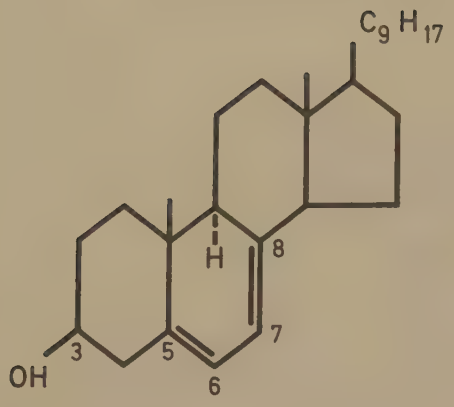
Les traits épais et continus indiqués sur les figures 1 et 2, représentent les groupements β attachés aux cycles et situés au-dessus du plan général du système, c'est-à-dire du même côté que les méthyles angulaires liés aux carbones 10 et 13. On représente au contraire les groupements α, situés au-dessous du plan du système, par des traits en pointillés.

Le poids moléculaire de ces isomères est 396,66.

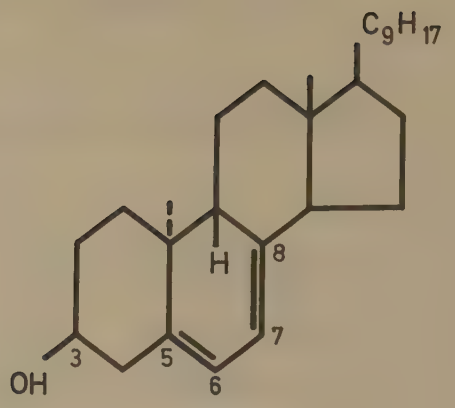
Le tableau I, page suivante, indique les pouvoirs rotatoires, pour la raie D du sodium (λ = 5890 Å) et les points de fusion caractéristiques de chaque corps :

Tableau I

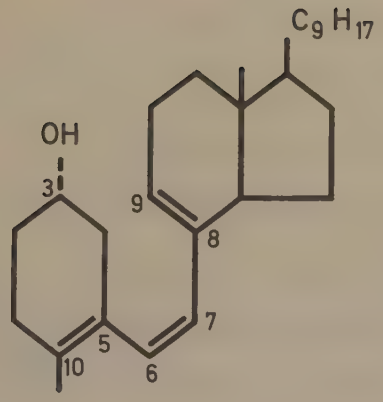
	$[\alpha]_D$	Point de fusion en °C
Ergostérol	- 130	165°
Lumistérol$_2$	+ 191	118°
Tachystérol$_2$	- 70	?
Prévitamine	+ 43	?
Vitamine D$_2$	+ 103	116°



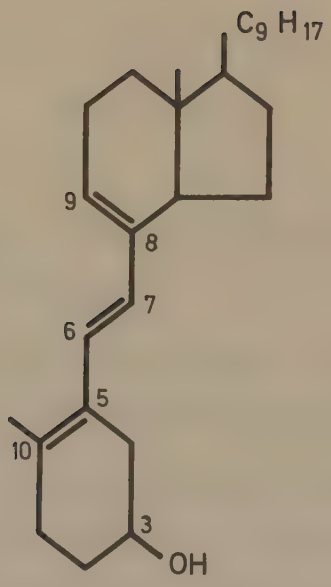
Ergostérol (E)



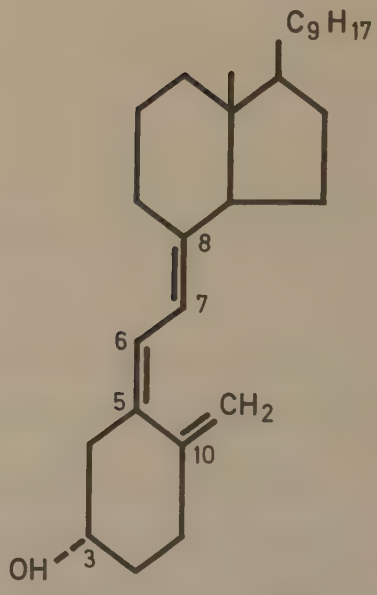
Lumistérol$_2$ (L)



Prévitamine (P)



Tachystérol$_2$ (T)



Vitamine D_2 (D)

Fig. 1

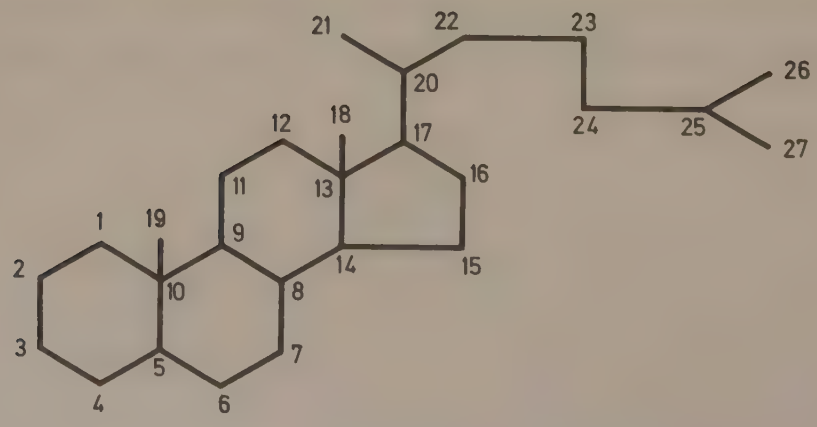


Fig. 2

2. - METHODES UTILISEES PAR LES AUTEURS PRECEDENTS POUR LA RECHERCHE DU SCHEMA REACTIONNEL. -

2.1. - PRINCIPE DES ETUDES ANTERIEURES. -

L'irradiation de l'ergostérol, effectuée avec des sources qui émettent un rayonnement ultraviolet situé dans la région spectrale d'absorption de l'ergostérol (entre les longueurs d'onde de 2400 Å et 3100 Å), donne naissance à trois isomères principaux (prévitamine, tachystérol$_2$, lumistérol$_2$) pour une température du milieu irradié inférieure à 20°C.

Trois types de sources ultraviolettes sont utilisées habituellement :

1) sources à vapeur de mercure à basse pression (qui émettent des radiations monochromatiques de longueurs d'onde 2537 Å et 3130 Å.
(90 %) (10 %)

2) sources à vapeur de mercure à haute pression (spectre d'émission très large, rayonnements polychromatiques).

3) sources à arc de magnésium (spectre d'émission constitué de radiations monochromatiques dont la plus intense est située à la longueur d'onde de 2852 Å).

L'examen des courbes d'évolution des différents isomères formés, pendant l'irradiation d'une solution d'ergostérol, permet de connaître le produit primaire (prévitamine) et les produits secondaires (tachystérol$_2$, lumistérol$_2$) (11).

Cette méthode est ensuite appliquée à chaque isomère (12) (13), irradiés successivement avec des sources à haute et à basse pression de mercure, afin de tenir compte de l'effet de longueur d'onde. On sait (14), en effet, que le lumistérol$_2$ et le tachystérol$_2$ sont obtenus avec des radiations ultraviolettes de longueurs d'ondes supérieures ou inférieures à 2700 Å, respectivement. Les sources à basse pression de mercure sont

employées soit avec un filtre de chlore gazeux à 2 atmosphères (11) (émission d'une seule radiation de longueur d'onde 2537 Å (99,9 %), soit sans filtre (15) (émission de deux radiations de longueurs d'onde 2537 Å (90 %) et 3130 Å (10 %). Les sources à haute pression de mercure sont toujours munies de filtres liquides parmi lesquels le mélange $NaBr . 2 H_2O$ (500 g) et Ag_2SO_4 (6,4 g) dans un litre d'eau distillée, absorbant les radiations inférieures à 2700 Å (12).

On reconstitue finalement le schéma réactionnel le plus approprié au vu des différents résultats expérimentaux obtenus par l'irradiation ultraviolette de chacun des quatre isomères photochimiques.

Cette méthode, basée sur l'observation des pentes des différentes courbes d'évolution, est adéquate seulement pour la résolution des schémas réactionnels contenant toutes les espèces moléculaires reliées à la suite les unes des autres, comme dans un schéma du type de celui proposé par Windaus.

Elle présente, par contre, de graves lacunes pour l'analyse des schémas réactionnels plus complexes, comme ceux proposés par Velluz et Havinga.

D'une part, un isomère, le lumistérol$_2$ n'a été dosé que pour des concentrations importantes ; d'autre part, au moins pour l'irradiation aux grandes longueurs d'onde ultraviolettes, les auteurs précédents n'utilisent pas un rayonnement monochromatique ; or, l'effet de la longueur d'onde est très important puisqu'il peut favoriser, ou non, la formation de chaque espèce.

Cette méthode, pour être rigoureuse, devrait porter sur de nombreuses irradiations de chaque espèce (effectuées avec différents rayonnements monochromatiques), devrait tenir compte des divers coefficients d'extinction moléculaire et son application devrait être basée sur une méthode d'analyse quantitative valable pour toutes les espèces. Les trois derniers schémas réactionnels proposés par E. Havinga et ses

collaborateurs laissent subsister un doute sur la position réelle du lumistérol$_2$, la méthode analytique utilisée ne permettant pas de connaître avec assez de précision les différentes transformations possibles entre les espèces.

2.2.- PRINCIPES DES METHODES DE SEPARATION ET DE DOSAGE DES ISOMERES.-

2.2.1.- Ergostérol (E).-

La teneur en ergostérol des solutions irradiées est déterminée facilement car l'ergostérol forme, avec la digitonine, une digitonine insoluble, tandis que les produits de la décomposition photochimique ne sont pas précipités par ce réactif. On doit à Windaus (16) les premières études sur cette méthode d'analyse gravimétrique que nous décrirons dans le paragraphe 3.3.4.

2.2.2.- Prévitamine (P).-

Par la transformation de la prévitamine en dinitrobenzoate de vitamine D_2, obtenue par estérification et chauffage, L. Velluz (17) met en évidence la présence de cet isomère dans les mélanges obtenus après irradiation. E. Havinga (11) utilise la conversion de la prévitamine en vitamine D_2, obtenue par chauffage. Une solution dans l'éthanol de prévitamine donne, en effet, par chauffage à la température d'ébullition avec reflux, un mélange prévitamine-vitamine D_2 contenant 81 % de vitamine D_2.

La vitamine D_2 possédant une absorption ultraviolette spécifique environ deux fois plus élevée que celle de la prévitamine, l'augmentation de l'absorption, causée par l'isomérisation thermique, est proportionnelle à la concentration de la prévitamine dans le mélange irradié, à condition toutefois que la vitamine D_2 ne soit pas initialement présente dans ce mélange.

Cette méthode est plus souple que celle préconisée par Mulder et coll. (18) qui ont développé une méthode de dosage de la prévitamine et du tachystérol$_2$, basée sur la détermination colorimétrique avec le réactif de Nield's (19).

2.2.3.- Lumistérol$_2$ (L).-

Aucune méthode d'analyse pour le dosage direct du lumistérol$_2$ dans les produits d'irradiation n'a été trouvée.

- Windaus (20) fractionne le mélange lumistérol$_2$ - vitamine D_2 et sépare le lumistérol$_2$ sous forme d'acétate.

- Velluz (3) sépare le lumistérol$_2$ de la vitamine D_2 par l'intermédiaire du 3-5 dinitrobenzoate.

- Havinga (4) dose le lumistérol$_2$ soit par spectrophotométrie ultraviolette, soit par l'intermédiaire du 3-5 dinitrobenzoate.

La chimie du lumistérol$_2$ a été très étudiée par Sir Ewart Jones et coll. (21)

2.2.4.- Tachystérol$_2$ (T).-

Ce corps réagit très rapidement avec l'anhydride citraconique ; cette propriété est utilisée pour l'extraire du mélange d'irradiation.

- Windaus (22) sépare le tachystérol$_2$ sous forme de combinaison cristallisée : acétate de tachystérol$_2$ - anhydride citraconique, en traitant le mélange d'irradiation par l'anhydride citraconique.

- Velluz (3) utilise également cette méthode.

- Havinga (11) utilise une méthode spectrophotométrique basée sur la mesure de l'absorbance entre 3100 et 3200 Å. Dans cette région spectrale, le tachystérol$_2$ absorbe nettement plus que les autres isomères.

L'absorbance est toutefois corrigée pour tenir compte de l'absorbance résiduelle des trois autres isomères.

En conclusion, les isomères sont séparés et dosés par différentes méthodes appropriées à chaque isomère. On n'a trouvé aucune méthode de séparation et de dosage qui permette une analyse rapide des différents produits au cours de l'irradiation.

3. - DESCRIPTION DE LA METHODE UTILISEE DANS LA PRESENTE ETUDE. -

3.1. - PRINCIPE. -

Le problème principal est de rendre compte de l'évolution du nombre d'éléments de chaque espèce, au cours du temps, dans le système moléculaire formé par l'irradiation ultraviolette de l'ergostérol.

Pour cela, il est nécessaire de partir de résultats théoriques assez généraux qui mettent en évidence les liens qui existent nécessairement entre la forme générale de la courbe d'évolution d'une espèce donnée et les caractéristiques de structure du schéma réactionnel auquel participe, directement ou non, cette espèce.

On reliera ainsi les données observées sur une courbe d'évolution aux caractéristiques structurales du schéma réactionnel et il sera possible de montrer que telle ou telle forme d'évolution est compatible ou non avec tel schéma d'interactions.

La présente étude est donc effectuée en étudiant le schéma réactionnel d'un point de vue global, par l'irradiation ultraviolette de l'ergostérol uniquement, et non par constructions successives à partir de données analytiques obtenues en irradiant séparément chacun des composants du schéma réactionnel photochimique.

L'analyse quantitative de toutes les espèces formées dans une solution d'ergostérol soumise à un rayonnement incident de 2537 Å, permet de tracer les courbes d'évolution caractéristiques de chaque espèce.

Nous comparerons certaines propriétés de ces courbes d'évolution décrites dans le paragraphe suivant à celles calculées pour les trois derniers schémas réactionnels connus, les valeurs des rendements quantiques et des coefficients d'extinction moléculaire étant données dans la littérature.

Nous éviterons ainsi l'écueil que constitue l'effet de la longueur d'onde et, de plus, une méthode d'analyse que nous avons mise au point permet le dosage quantitatif de chaque isomère dans le milieu irradié.

Il ne sera pas, en définitive, nécessaire comme précédemment, de soumettre successivement chaque isomère à des radiations de longueurs d'onde différentes.

3.2.- PARTIE THEORIQUE.-

3.2.1.- Emprunts à la théorie générale de l'évolution des systèmes moléculaires proposés par P. Delattre (1).-

Cette théorie a permis de mettre en évidence un certain nombre de relations d'ordre qui permettent de mieux comprendre les phénomènes qui se produisent dans les systèmes moléculaires irradiés.

Nous avons emprunté à cette théorie générale, résumée ci-dessous, son formalisme et deux méthodes qui nous ont semblé adéquates pour notre étude.

La première étape consiste à reconnaître l'existence d'objets ou d'entités, considérés comme distincts, et qui constituent les éléments du système étudié. Chaque élément est défini par un certain nombre de caractéristiques (niveau énergétique des électrons dans les atomes ou molécules, énergie cinétique des molécules constitutives d'un gaz ou d'un plasma, structure chimique, point de fusion, nombre d'atomes de C , H , O , etc ...) considérées comme suffisantes pour rendre compte du comportement de l'élément.

Compte tenu des données ainsi retenues, plusieurs éléments peuvent apparaître identiques ; ils constituent alors une classe d'équivalence.

Les caractéristiques qui servent à définir un élément constituent les caractéristiques intrinsèques de la classe à laquelle il appartient. Selon le niveau de description choisi, les éléments peuvent correspondre

à des particules élémentaires, des atomes, des molécules, des organes, des organismes, etc ... Dans le cas qui nous intéresse ici, nous nous situerons au niveau des molécules.

On peut définir également des caractéristiques extrinsèques du système, c'est-à-dire des caractéristiques qui ne sont pas propres à une classe particulière d'éléments, mais qui sont valables pour l'ensemble des éléments d'un système moléculaire. Par exemple, la température ou les caractéristiques d'un champ électromagnétique extérieur appliqué à l'ensemble d'un système peuvent être considérées comme des caractéristiques extrinsèques. Sous l'effet des interactions qui se produisent entre les éléments, ou sous l'effet d'actions extérieures, les éléments peuvent subir des transformations qui les font passer d'une classe à une autre du système.

La possibilité d'une transformation d'éléments d'une classe E_i vers une classe E_j peut être schématisée par une liaison orientée comme l'indique la figure 3. La fonction f_{ij} associée à une telle liaison doit exprimer les conditions dans lesquelles la transformation se produit.

La théorie, établie de manière axiomatique, utilise dans une première phase, les deux axiomes suivants :

Axiome 1.

La répartition des éléments dans les classes d'équivalence est telle que tous les éléments d'une même classe ont des fonctions identiques vis-à-vis des autres éléments du système, c'est-à-dire vis-à-vis de l'ensemble du système.

Axiome 2.

Parmi les transformations possibles entre classes, certaines peuvent être directement inversibles, alors que d'autres ne le sont pas. (Une transformation entre deux classes E_k et E_j est dite directement inversible si les fonctions d'interactions f_{kj} et f_{jk} existent simultanément).

On en déduit des propriétés valables pour des systèmes très divers (décomposition en graphes vrais ....) et pas seulement pour des systèmes moléculaires.

Lorsque l'on veut étendre la théorie au cas des systèmes moléculaires, il faut :

- préciser les conditions pour que l'axiome 1 soit respecté. Ceci est fait par le critère de répartition des éléments en classes d'équivalence :

a) L'identité des éléments à l'intérieur d'une espèce, ou classe d'équivalence, est définie par le fait que ces éléments doivent tous comporter les mêmes noyaux d'atomes et le même nombre d'électrons situés aux mêmes niveaux énergétiques.

b) Deux éléments qui diffèrent par la situation énergétique d'au moins un électron sont considérés comme appartenant à deux classes différentes.

c) Les éléments d'une même espèce doivent en outre être soumis aux mêmes contraintes externes vis-à-vis d'un élément quelconque du système.

- Puis, si l'on veut faire la théorie analytique des systèmes moléculaires soumis à un rayonnement, il faut préciser la forme générale des fonctions f_{ij}, c'est-à-dire des différentes interactions pouvant conduire à des transformations d'éléments.

Axiome 3.

Dans un système moléculaire, chaque transformation élémentaire provoquée par le rayonnement sur une classe de molécules équivalentes, s'exprime, en nombre de transformations par unité de temps, par un terme ou par une somme de termes de la forme $N \sigma \bar{\phi}$.

Axiome 4. -

Dans un système moléculaire, chaque transformation élémentaire spontanée subie par une classe de molécules équivalentes s'exprime, en nombre de transformations par unité de temps, par un terme de la forme $\eta \cdot N$; η étant un facteur de proportionnalité et N, le nombre d'éléments de la classe considérée.

Axiome 5. -

Une transformation élémentaire faisant intervenir simultanément α_g, α_j, ---- α_k éléments de classes E_g, E_j ---- E_k, s'exprime, en nombre de transformations par unité de temps, par une expression de la forme $K.N_g^{\alpha_g}$, $K.N_j^{\alpha_j}$, ---- $K.N_k^{\alpha_k}$, K étant un facteur de proportionnalité et N_g, N_j ---- N_k, représentant le nombre d'éléments présents dans chacune des classes considérées.

Les transformations résultant d'interactions susceptibles de se produire entre le rayonnement incident et les diverses molécules d'un système tel que celui de l'ergostérol à basse température, relèvent de l'axiome 3.

Nous avons vu, dans la description des différents schémas réactionnels, que la vitamine D_2 est produite par une action thermique sur la prévitamine. Cette transformation, réversible, spontanée, obéit à l'axiome 4.

Par contre, il n'existe pas de transformations faisant intervenir simultanément des éléments de différentes classes dans le système photochimique étudié et on peut, dans ce cas, négliger l'axiome 5.

L'absence de l'axiome 5 exclut les termes non linéaires et nous pouvons donc utiliser le formalisme linéaire dont les propriétés générales sont bien connues.

3.2.2. - Formalisme utilisé. -

Il est utile de rappeler quelques définitions classiques en théorie des graphes .

- les noeuds ou sommets du graphe représentent les classes d'équivalence. Ce sont les points de départ ou d'aboutissement des relations.

- les arcs sont les relations orientées entre les classes, schématisant les fonctions d'interactions.

- un chemin est une succession d'arcs telle que l'extrêmité terminale de chaque arc ait même sommet que l'extrêmité initiale de l'arc suivant.

- une composante du graphe est un ensemble de sommets et des liaisons qui existent entre eux.

Un système moléculaire peut être représenté par un graphe, dont les noeuds représentent les différentes espèces ou les différents états moléculaires, les liaisons entre les noeuds représentant les transformations possibles pour les éléments du système. Le graphe peut être plus ou moins compliqué (la figure 4 donne un exemple arbitraire d'un tel graphe).

P. Delattre a montré que dans un système quelconque représentable par un graphe, il était possible de mettre en évidence un certain nombre de propriétés tout à fait générales qui peuvent faciliter grandement l'étude des systèmes moléculaires.

a) Définition et propriétés de quatre types fondamentaux de graphes. -

Un graphe est dit fortement connexe, si pour tout couple de sommets E_i et E_j (i et j quelconques), il est possible de trouver un chemin de E_i à E_j et un chemin de E_j à E_i. Les sommets rencontrés sur un des chemins

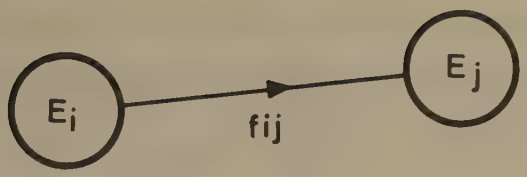


Fig. 3

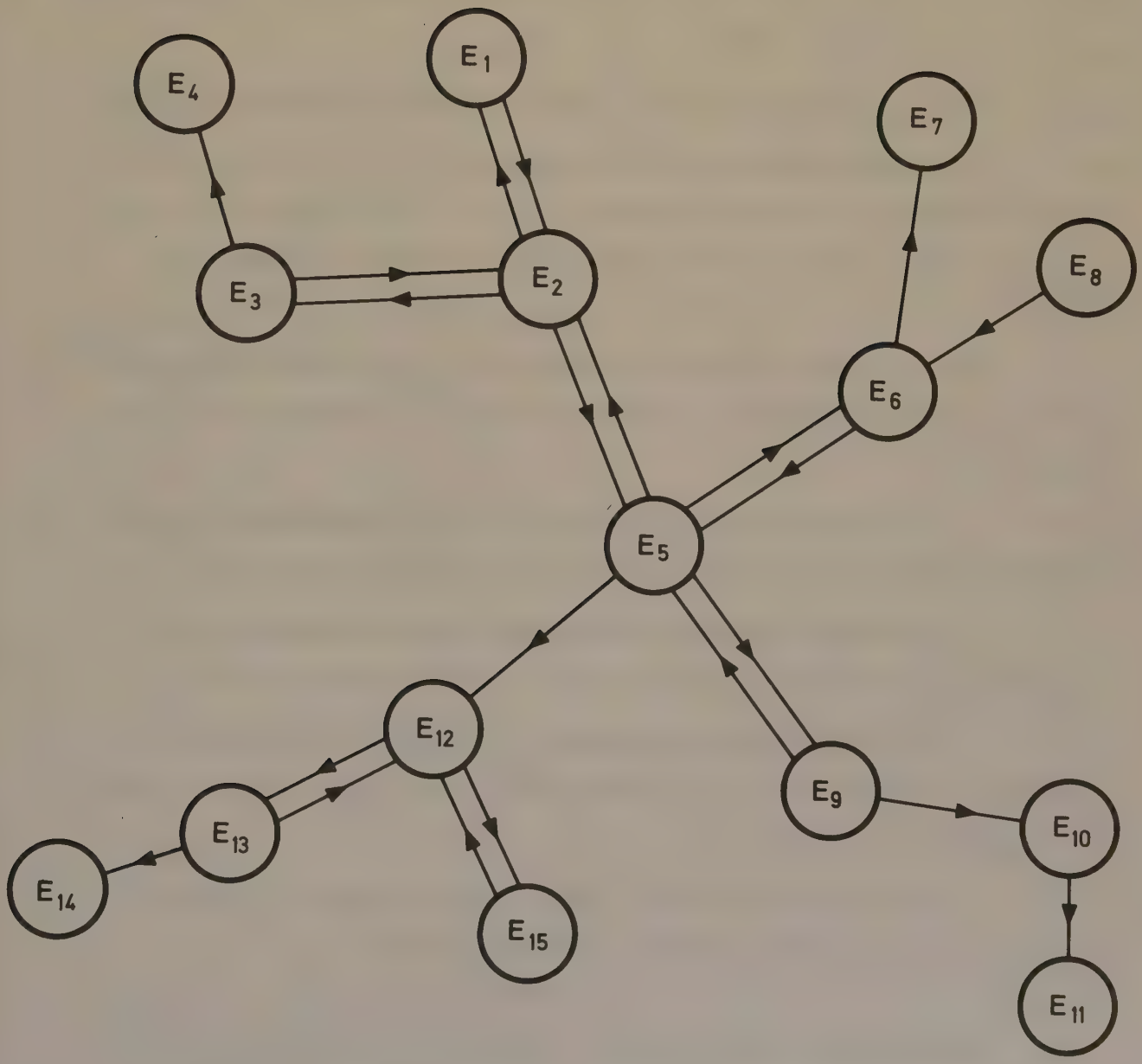


Fig. 4

peuvent être différents de ceux rencontrés sur l'autre chemin. Les graphes des figures 4 et 5 ne sont pas fortement connexes contrairement aux graphes des figures 6 et 7.

Dans le formalisme utilisé ici, on appelle graphe vrai, un graphe (ou une composante) fortement connexe maximale, c'est-à-dire un graphe qui ne peut pas constituer, par l'adjonction d'un ou plusieurs graphes adjacents, un nouveau graphe fortement connexe. Autrement dit, les liaisons entre deux graphes vrais quelconques ne peuvent jamais comporter de couples d'arcs correspondant à une transformation donnée et à son inverse direct. Si tel était le cas, nous n'aurions plus affaire à deux graphes vrais, mais à un graphe vrai unique.

Ceci est clairement visible dans l'exemple donné par la figure 8.

L'existence simultanée des deux arcs f_{24} et f_{42} fait que les deux composantes fortement connexes A et B ne constituent pas chacune un graphe vrai, mais que seule leur réunion constitue un graphe vrai unique.

Il est possible de définir quatre types fondamentaux de graphes vrais, et quatre seulement, selon le sens des arcs qui traversent leur frontière.

- Le Graphe Exotrope Vrai (GExV) est un graphe vrai dont la frontière n'est traversée que par des arcs divergents (figure 9).

- Le Graphe Endotrope Vrai (GEnV) est un graphe dont la frontière n'est traversée que par des arcs convergents (figure 10).

- Le Graphe Mixte Vrai (GMV) est un graphe vrai dont la frontière est traversée à la fois par des arcs divergents et par des arcs convergents (figure 11).

- Le Graphe Fermé Vrai (GFV) est un graphe vrai dont la frontière n'est traversée par aucun arc (figure 12).

Si l'on tient compte du sens des arcs qui traversent les frontières respectives des quatre types de graphes vrais, on constate

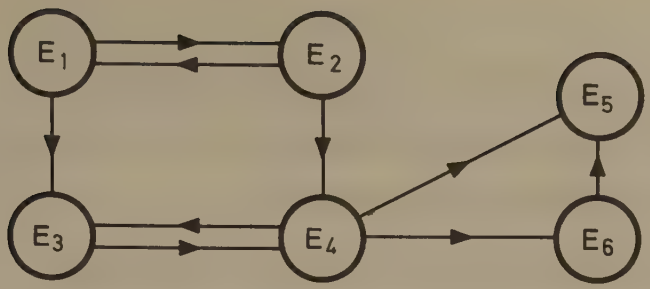


Fig. 5

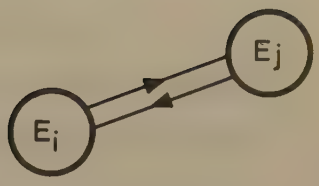


Fig. 6

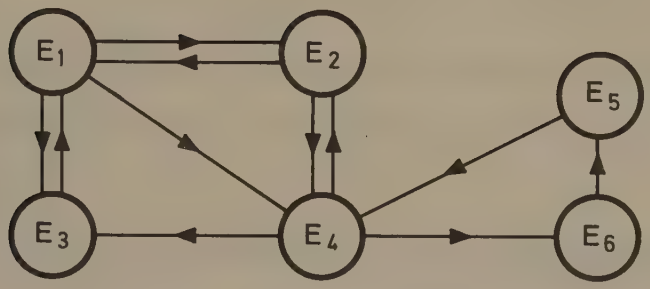


Fig. 7

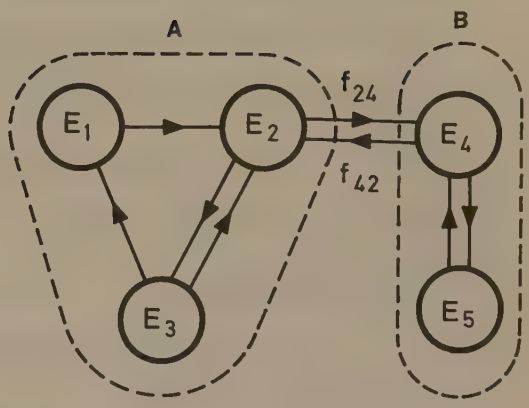


Fig. 8

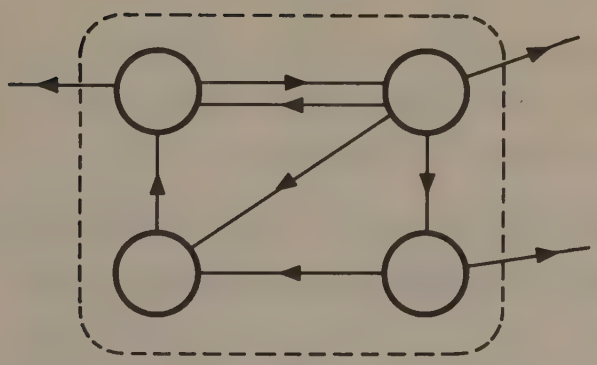


Fig. 9

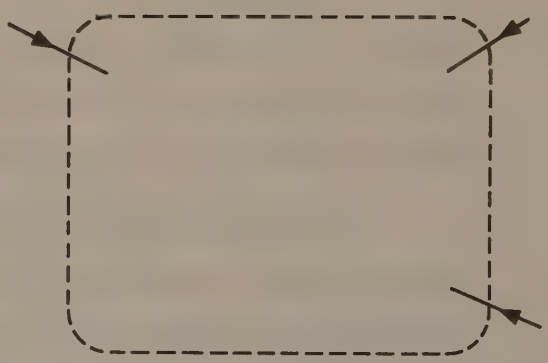


Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

immédiatement que :

- un graphe exotrope vrai (GExV) ne peut être relié qu'à des graphes mixtes vrais ou à des graphes endotropes vrais, ces deux types de graphe étant situés dans la descendance du premier.

- un graphe mixte vrai (GMV) ne peut être relié qu'à des graphes exotropes vrais situés dans son ascendance, ou à des graphes mixtes vrais situés dans son ascendance ou dans sa descendance, ou à des graphes endotropes vrais situés dans sa descendance.

- un graphe endotrope vrai (GEnV) ne peut être relié qu'à des graphes exotropes vrais ou à des graphes mixtes vrais, tous situés dans son ascendance.

- un graphe fermé vrai (GFV) n'est, par définition, relié à aucun autre graphe.

Ainsi les graphes vrais sont parfaitement adaptés à la mise en évidence des chaînes de filiation à l'intérieur d'un système quelconque de transformations. Par le fait même, ils permettent d'analyser clairement les processus qui président à l'évolution d'un système.

La figure 13 donne un exemple de décomposition d'un système en graphes vrais, où seules les frontières des graphes vrais et les arcs qui les traversent sont représentés.

D'une manière générale, l'évolution d'un système se traduira par les phénomènes suivants :

- Les graphes exotropes vrais, ne pouvant que perdre des éléments, se videront peu à peu. Ils finiront par disparaître complètement ou deviendront des graphes fermés.

- Lorsque les graphes exotropes vrais situés dans l'ascendance d'un graphe mixte vrai sont devenus vides ou fermés, ce graphe mixte devient à son tour un graphe exotrope, qui subit l'évolution décrite ci-dessus.

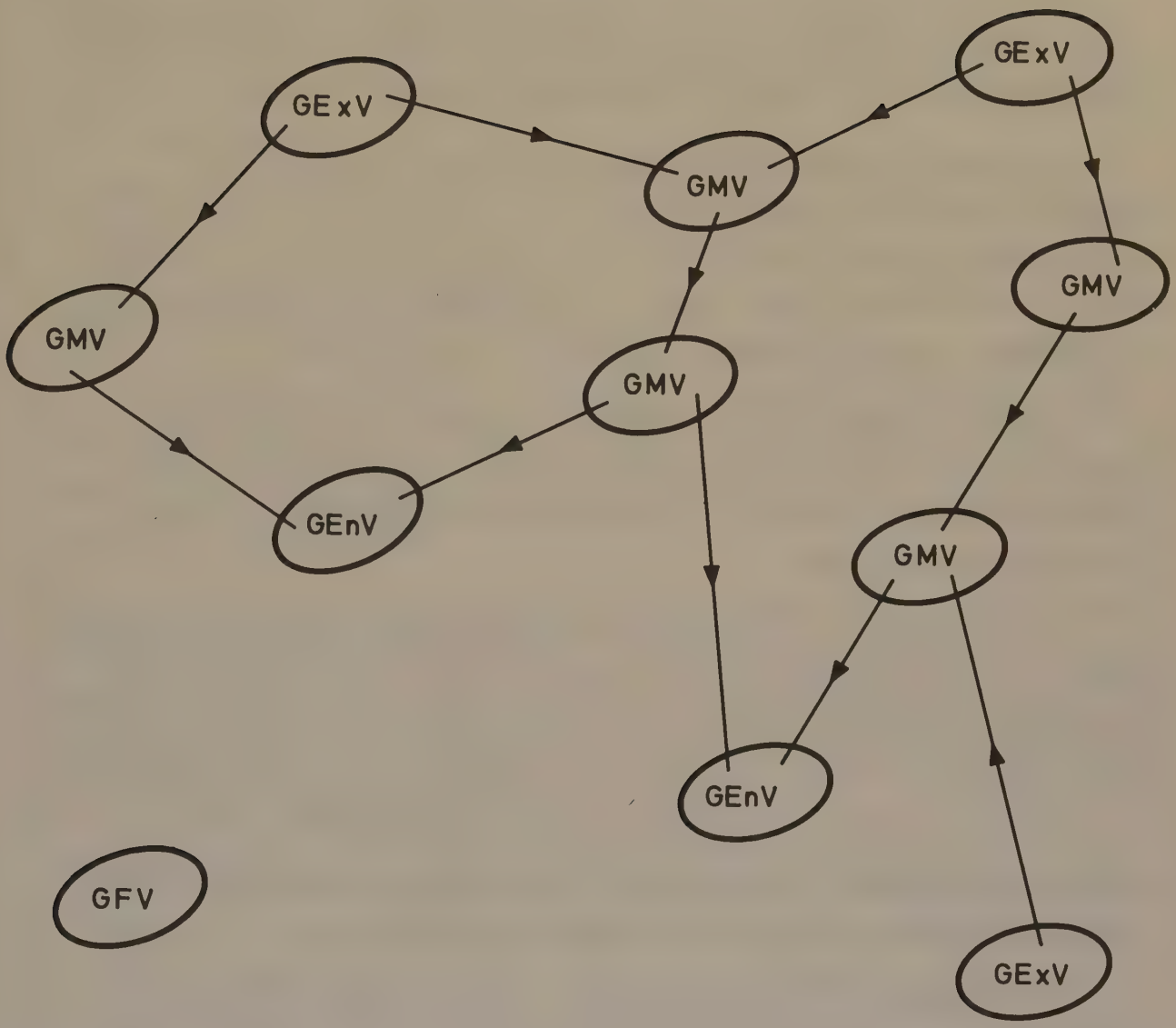


Fig. 13

- Lorsque les graphes mixtes vrais et les graphes exotropes vrais, situés dans l'ascendance d'un graphe endotrope vrai sont devenus vides ou fermés, ce graphe endotrope devient à son tour un graphe fermé et sa structure interne n'évolue plus.

La seule condition que doit remplir un système pour être décomposable en graphes vrais est qu'il ne soit pas fortement connexe.

Si le graphe total du système est connu, sa décomposition en graphes vrais peut faciliter ou simplifier son étude analytique. En effet, l'évolution du nombre d'éléments d'une classe ne dépend que du graphe vrai auquel appartient cette classe, et des graphes situés dans son ascendance, et non des graphes situés dans sa descendance.

Dans la plupart des cas, cependant, le graphe total du système est inconnu. Les propriétés énoncées ci-dessus peuvent cependant permettre d'accéder à certaines données qualitatives concernant la structure interne de ce graphe.

Par exemple, si l'on suppose seulement que les équations différentielles d'évolution du système sont linéaires, sans autre hypothèse sur la structure précise du graphe, il est déjà possible de démontrer quelques théorèmes utiles. C'est ainsi que certains aspects des courbes d'évolution du nombre d'éléments dans différentes classes peuvent être reliés à certaines propriétés comparatives de ces classes, comme l'appartenance à un même graphe vrai ou à des graphes vrais différents.

Nous avons effectivement utilisé, dans la présente étude, cette méthode théorique pour lever l'ambiguité entre les trois schémas réactionnels, les travaux de nos prédécesseurs nous permettant de dire que ces schémas correspondent à des graphes exotropes vrais de structures internes différentes et que les équations d'évolution sont linéaires.

3.2.3.- Etude analytique d'un système moléculaire linéaire.-

Les interactions dans un tel système ne font pas intervenir simultanément des éléments appartenant à des classes différentes (ce qui introduirait des termes non-linéaires dans les équations analytiques), mais uniquement des transformations induites par le rayonnement sur chacune des classes E , P , T , L ; et éventuellement des transformations spontanées entre P et D si la température est supérieure à 20°C environ.

Nous avons vu, en figure 3, que la transformation d'éléments d'une classe E_i vers une classe E_j peut être schématisée par une liaison orientée. La fonction f_{ij} associée à une telle liaison doit exprimer les conditions dans lesquelles la transformation se produit.

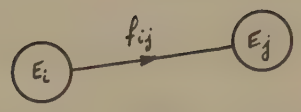
Chaque fonction f_{ij} peut, en fait, être plus ou moins complexe selon les caractéristiques dont elle dépend : caractéristiques des éléments de une ou plusieurs classes, caractéristiques d'actions extérieures telles que le rayonnement.

La fonction f_{ij} la plus simple est la fonction qui ne dépend que des caractéristiques des éléments de la classe de départ E_i , du nombre d'éléments contenus dans cette classe, et des caractéristiques d'une action extérieure. Nous avons alors un système différentiel linéaire dont le traitement analytique complet est possible.

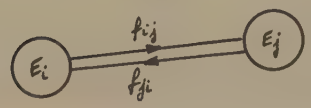
Nous donnons ci-après quelques exemples d'équations d'évolution.

Exemples

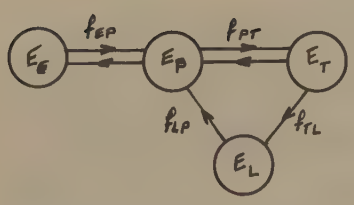
Equations d'évolution de l'espèce E_i, par exemple



$$\frac{d N_i}{dt} = - f_{ij} N_i$$

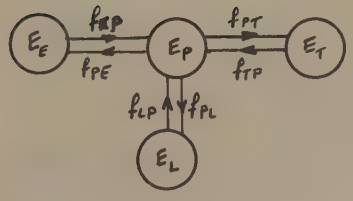


$$\frac{d N_i}{dt} = - f_{ij} N_i + f_{ji} N_j$$



$$\frac{d N_p}{dt} = - (f_{PT} + f_{PE}) N_p + f_{EP} N_E + f_{TP} N_T + f_{LP} N_L$$

terme a_{jj} ci-dessous



$$\frac{d N_p}{dt} = - (f_{PT} + f_{PE} + f_{PL}) N_p + f_{EP} N_E + f_{TP} N_T + f_{LP} N_L$$

terme a_{jj} ci-dessous

Pour des systèmes plus complexes, l'évolution du nombre d'éléments d'une espèce donnée E_j (ou cardinal N_j de la classe correspondante) en fonction du temps est, sous la forme la plus générale :

$$\frac{d N_j}{dt} = f_{1j} N_1 + f_{2j} N_2 + \text{----} f_{kj} N_k - a_{jj} N_j + f_{nj} N_n$$

Le terme général a_{jj} contient l'ensemble des termes de disparition de l'espèce E_j et il est donc égal à :

$$a_{jj} = f_{j1} + f_{j2} + \text{----} + f_{j(j-1)} + f_{j(j+1)} + \text{----} + f_{je}$$

f_{je} représente les éventuelles sorties d'éléments de E_j vers l'extérieur du système considéré.

L'équation d'évolution s'écrira donc, sous la forme matricielle :

$$\left\{ \frac{d N_j}{dt} \right\} = \boxed{a} \left\{ N_j \right\}$$

dont la solution générale est :

$$\{N_j\} = e^{(t - t_o)\,[a]}\,\{N_o\}$$

$\{N_o\}$ représentant les valeurs des cardinaux des espèces à l'instant initial t_o .

En choisissant systématiquement $t_o = 0$, on a :

$$\{N_j\} = e^{t\,[a]}\,\{N_o\}$$

Les formules de Fraser, Duncan et Collar (23) donnent, si $\lambda_1 , \lambda_2 , \text{----} , \lambda_n$ sont les valeurs propres de la matrice $[a]$:

$$e^{t\,[a]} = [\xi] = e^{\lambda_1 t}\,[G_1] + e^{\lambda_2 t}\,[G_2] + \text{---------} + e^{\lambda_n t}\,[G_n]$$

avec

$$[G_i] = \frac{\prod_{j \neq i} (\lambda_j\,[1] - [a])}{\prod_{j \neq i} (\lambda_j - \lambda_i)}$$

$$[G_i] = \begin{bmatrix} \gamma_{i11} & \gamma_{i12} & \text{-----} & \gamma_{i1n} \\ \gamma_{i21} & \gamma_{i22} & \text{-----} & \gamma_{i2n} \\ \gamma_{in1} & \gamma_{in2} & \text{-----} & \gamma_{inn} \end{bmatrix}$$

La matrice $e^{t\,[a]} = [\xi]$ est encore du même ordre que $[a]$

$$e^{t\,[a]} = [\xi] = \begin{bmatrix} \xi_{11} & \xi_{12} & \text{-----} & \xi_{1n} \\ \xi_{21} & \xi_{22} & \text{-----} & \xi_{2n} \\ \xi_{n1} & \xi_{n2} & \text{-----} & \xi_{nn} \end{bmatrix}$$

dont le terme général est :

$$\xi_{jk} = \sum_{i=1}^{i=n} \gamma_{ijk} \cdot e^{\lambda_i t}$$

On a vu que $\{N_j\} = [\xi] \{N_o\}$. En développant, on a pour l'espèce quelconque E_j :

$$N_j = \sum_{k=1}^{k=n} \xi_{jk} \cdot N_{ok}$$

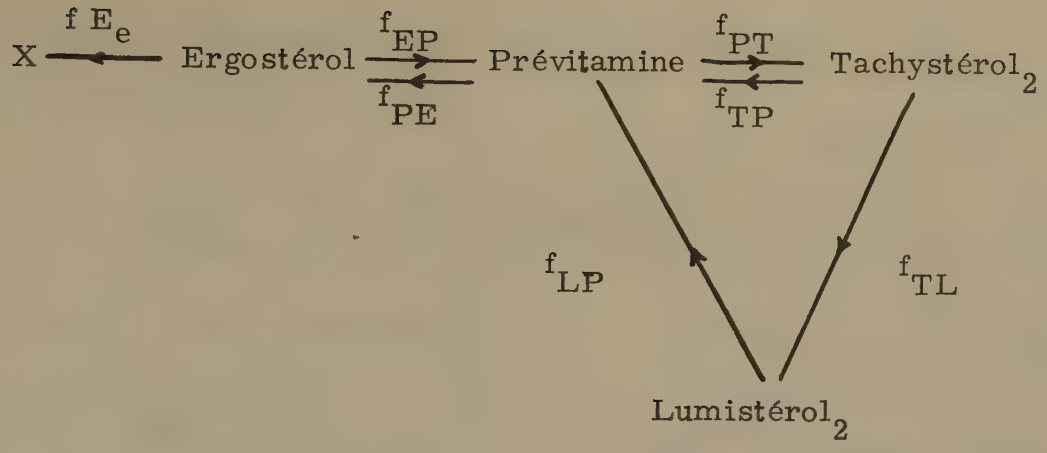
En remplaçant ξ_{jk} dans cette dernière équation, on obtient l'équation d'évolution générale d'une espèce quelconque E_j, sous forme condensée :

$$N_j = \sum_{k=1}^{k=n} \sum_{i=1}^{i=n} \gamma_{ijk} \cdot e^{\lambda_i t} \cdot N_{ok} \qquad (1)$$

L'évolution d'une espèce quelconque d'un graphe vrai dépend donc de toutes les fonctions d'interactions qui existent dans le graphe (par la matrice $[a]$ qui détermine les valeurs propres λ_i et les $[G_i]$, donc les γ_{ijk}) et des valeurs initiales de toutes les espèces contenues dans ce graphe.

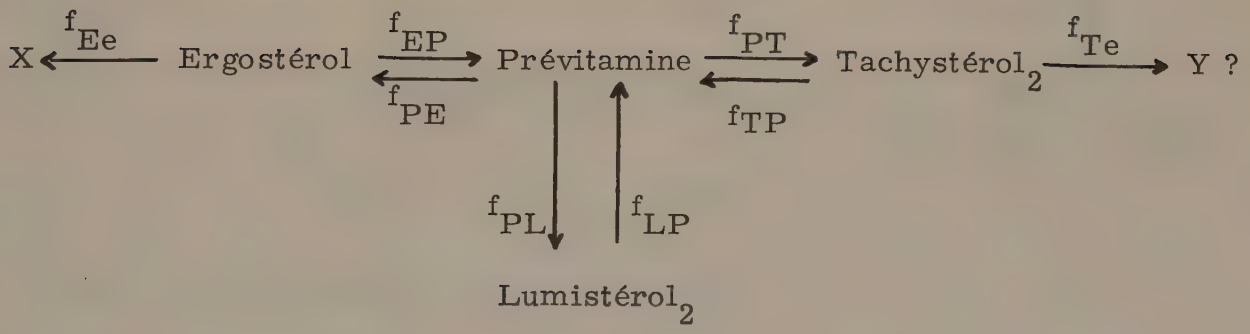
Application au cas particulier du système photochimique de l'Ergostérol.

Nous donnons ci-dessous les matrices $[a_1]$ $[a_2]$ et $[a_3]$ correspondant respectivement à chacun des trois schémas réactionnels photochimiques de l'ergostérol, dans le cas où la température dans le milieu d'irradiation est suffisamment faible pour éviter le passage thermique de la prévitamine à la vitamine D_2 .



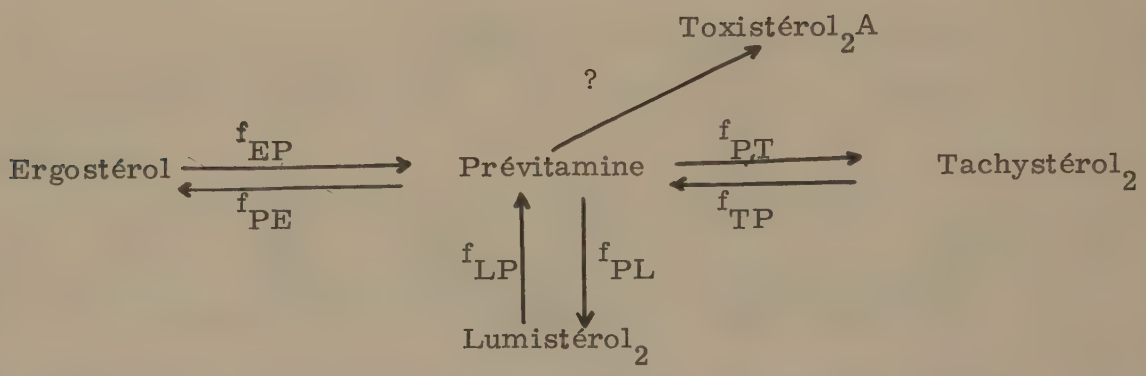
Graphe 1

$$\boxed{a_1} = \begin{array}{c} \\ E \\ P \\ T \\ L \end{array} \begin{array}{c} \begin{array}{cccc} E & P & T & L \end{array} \\ \begin{bmatrix} -(f_{EP} + f_{Ee}) & +f_{PE} & 0 & 0 \\ +f_{EP} & -(f_{PT} + f_{PE}) & +f_{TP} & +f_{LP} \\ 0 & +f_{PT} & -(f_{TP} + f_{TL}) & 0 \\ 0 & 0 & +f_{TL} & -f_{LP} \end{bmatrix} \end{array}$$



Graphe 2

$$\boxed{a_2} = \begin{array}{c} \begin{matrix} E & P & T & L \end{matrix} \\ \begin{bmatrix} -(f_{EP} + f_{Ee}) & +f_{PE} & 0 & 0 \\ +f_{EP} & -(f_{PE} + f_{PL} + f_{PT}) & +f_{TP} & +f_{LP} \\ 0 & +f_{PT} & -(f_{TP} + f_{Te}) & 0 \\ 0 & +f_{PL} & 0 & -f_{LP} \end{bmatrix} \end{array} \begin{matrix} E \\ P \\ T \\ L \end{matrix}$$



Graphe 3

$$\boxed{a_3} = \begin{array}{c} \begin{matrix} E & P & T & L \end{matrix} \\ \begin{bmatrix} -f_{EP} & +f_{PE} & 0 & 0 \\ +f_{EP} & -(f_{PE} + f_{PT} + f_{PL} + f_{PTox}) & +f_{TP} & +f_{LP} \\ 0 & +f_{PT} & -f_{TP} & 0 \\ 0 & +f_{PL} & 0 & -f_{LP} \end{bmatrix} \end{array} \begin{matrix} E \\ P \\ T \\ L \end{matrix}$$

avec la fonction d'interaction f_{ij}, généralisant la transformation de l'espèce i vers l'espèce j :

$$f_{ij} = K_{ij} + K \cdot \phi \cdot \varphi_{ij} \cdot \varepsilon_i$$

K_{ij} = constante de vitesse thermique, nulle sauf pour la prévitamine.

K = constante dépendant des unités utilisées.

ε_i = coefficient d'extinction moléculaire de l'espèce i.

ϕ = flux de photons incidents en ph/cm^2/sec.

φ_{ij} = rendement quantique de l'espèce i.

Si les valeurs propres de la matrice [a] qui ont toutes une partie réelle négative sont suffisamment distinctes, on voit (équation 1), que l'évolution d'une espèce quelconque du graphe vrai tendra vers la fonction d'évolution suivante (avec λ_m = valeur propre de valeur absolue minimum et i = m)

$$N_j = e^{\lambda_m t} \cdot \sum_{k=1}^{k=n} \gamma_{mjk} \cdot N_{ok} \qquad (2)$$

puisque toutes les autres exponentielles, pour $i \neq m$ s'éteindront plus vite que $e^{\lambda_m t}$.

ou $N_j = e^{\lambda_m t} \cdot A_j$ avec $A_j = \sum_{k=1}^{k=n} \cdot \gamma_{mjk} \cdot N_{ok}$

et $\text{Log } N_j = \lambda_m t + \text{Log } A_j$

La courbe d'évolution en fonction du temps tend donc vers une <u>seule</u> exponentielle, $e^{\lambda_m t}$, c'est-à-dire vers une partie rectiligne en coordonnées semi-logarithmiques. (fig. 14)

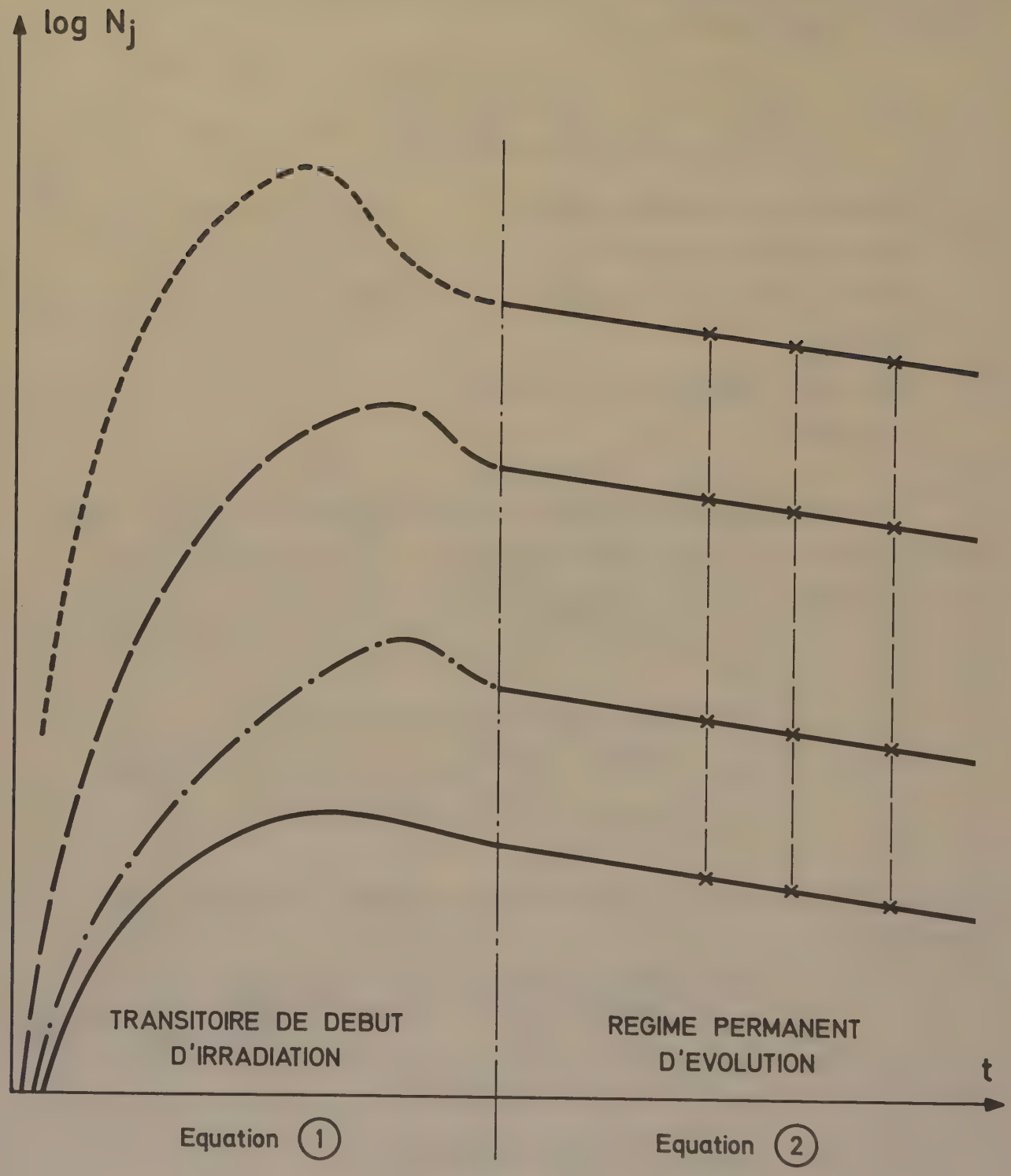

log N_j
TRANSITOIRE DE DEBUT
D'IRRADIATION
REGIME PERMANENT
D'EVOLUTION
t
Equation (1)
Equation (2)

Fig. 14

On appelle régime permanent d'évolution cette partie de l'évolution qui se traduit par une fonction rectiligne en coordonnées semi-logarithmiques.

Le pente en régime permanent d'évolution correspond à la valeur propre de valeur absolue minimum λ_m, et elle est la même pour toutes les espèces du graphe vrai considéré.

Si on ne connaissait que les classes du graphe et rien des relations entre ces classes, on pourrait trouver ces relations par des mesures en nombre suffisant effectuées pendant le régime transitoire de début d'irradiation (1 - Chap. III). Mais, ici, il n'était nécessaire que de discriminer entre trois graphes possibles et on a cherché à obtenir cette discrimination à partir de mesures effectuées seulement en régime permanent d'évolution (fig. 14). Et cela s'est avéré possible comme nous allons le voir maintenant.

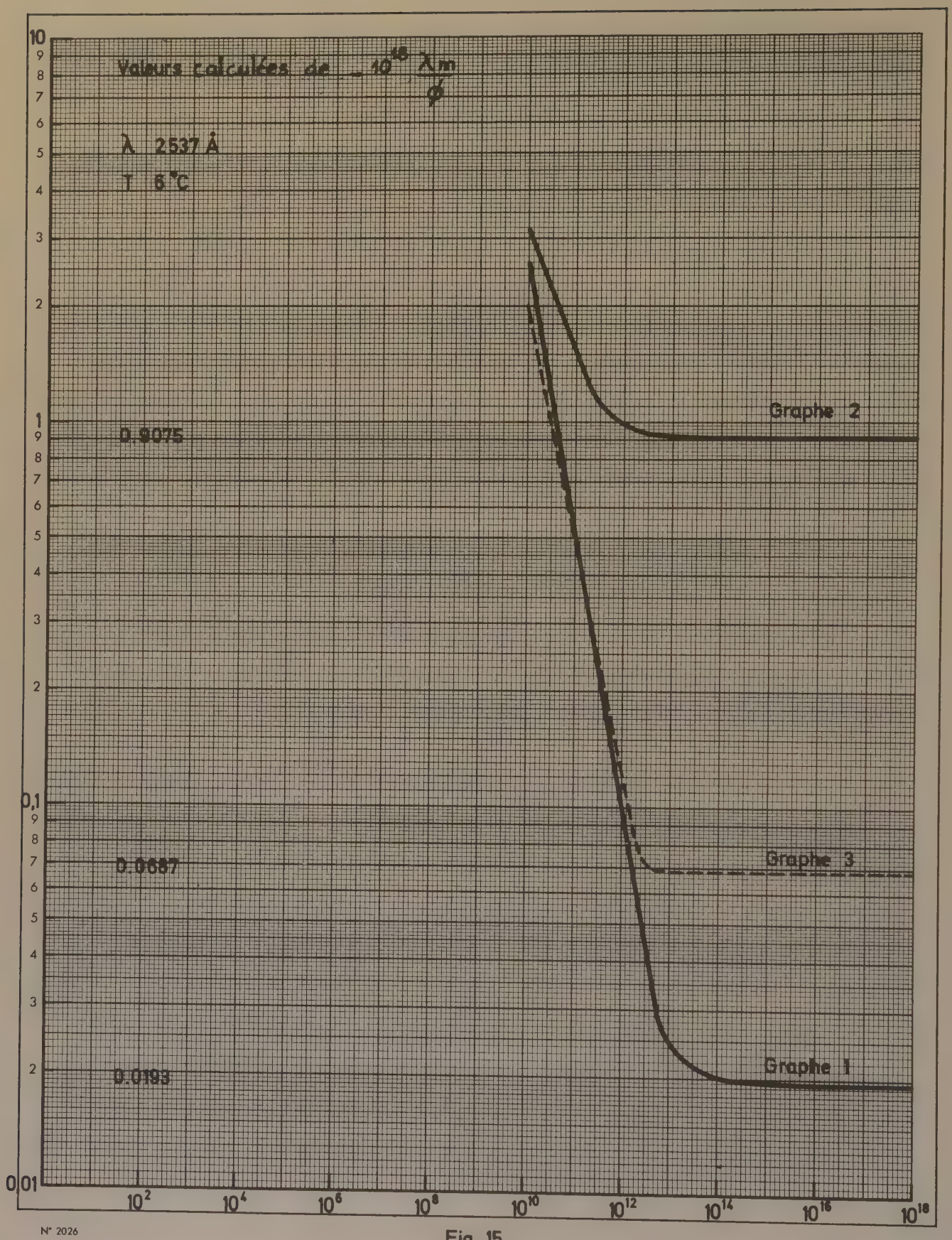
3.2.4. - Deux nouvelles méthodes permettant de lever l'ambiguité entre trois schémas réactionnels. -

Nous avons utilisé deux nouvelles méthodes qui permettent de lever l'ambiguité entre plusieurs schémas réactionnels et nous les avons appliquées à l'étude du système photochimique de l'ergostérol.

a) 1ère Méthode : Mesure de la valeur propre minimum λ_m. -

Le principe de la méthode est de mesurer la pente λ_m, en suivant l'évolution, soit de la concentration d'une seule espèce, soit d'une grandeur physique proportionnelle à une quelconque combinaison linéaire des concentrations des espèces, par exemple, l'absorbance pour une longueur d'onde donnée.

Nous avons utilisé dans le calcul des fonctions d'interactions, les valeurs des rendements quantiques et des coefficients d'extinction moléculaire données dans la littérature et nous avons obtenu des valeurs propres minimum différentes pour les trois schémas réactionnels proposés (Fig. 15).


Valeurs calculées de $10^{16} \frac{\lambda m}{\phi}$
λ 2537 Å
T 6 °C
0,9075
0,0687
0,0193
Graphe 2
Graphe 3
Graphe 1
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0,1
0,01
10^2
10^4
10^6
10^8
10^{10}
10^{12}
10^{14}
10^{16}
10^{18}

N° 2026

Fig. 15

La spectrophotométrie ultraviolette, méthode expérimentale très sensible, a été utilisée pour la mesure de la valeur propre minimum λ_m.

Chaque isomère, séparé par la chromatographie sur colonne, puis analysé par la chromatographie en phase gazeuse pour s'assurer de sa pureté, est irradié avec la source ultraviolette décrite au paragraphe 3.3.1.

L'évolution de chacun des isomères est alors suivie pour différentes longueurs d'onde d'analyse, toutes situées dans la zone spectrale où certains isomères de l'ergostérol (toxistérols), extérieurs au graphe vrai, présentent une absorption négligeable par rapport à celle des quatre espèces du graphe vrai.

b) 2ème Méthode : Vecteur propre correspondant à λ_m. -

On utilise le fait que la composition relative des espèces du graphe vrai reste constante, dans le régime permanent d'évolution. Le principe de cette méthode est de déterminer expérimentalement la composition relative des espèces en régime permanent d'évolution et de la comparer à celles qui ont été calculées pour les trois graphes en présence. Nous avons mis au point une méthode expérimentale qui permet de connaître non seulement l'évolution de la concentration d'une seule espèce mais également de chacune des quatre espèces séparément.

Le tableau III donne les différentes valeurs calculées des compositions relatives pour les trois graphes en présence, pour la longueur d'onde d'irradiation de 2537 Å.

Tableau III

Espèces	G_1	G_2	G_3
E	2,10	2,36	2,44
P	19,00	17,99	21,90
T	67,54	77,91	73,78
L	11,35	1,72	1,86

On remarque que l'ambiguité entre les trois graphes peut être levée par une mesure suffisamment précise du tachystérol$_2$ et de la prévitamine.

Les calculs numériques des valeurs propres minimum λ_m (fig. 15) et des compositions relatives (tableau III), pour chacun des trois graphes G_1, G_2, G_3, en régime permanent d'évolution, ont été effectués à l'aide d'un ordinateur.

On trouvera ci-dessous les spécifications techniques du programme FORTRAN mis au point par G. Naudet.

Spécifications techniques du programme FORTRAN.

On détermine les caractéristiques générales (matrices d'évolution, valeurs propres, régime permanent d'évolution) pour un graphe linéaire d'espèces photoisomériques, ce graphe pouvant ne pas être complet, c'est-à-dire ne pas comporter toutes les relations binaires entre les différentes classes. Les fonctions entre les classes peuvent dépendre du rayonnement (axiome 3) ou ne pas en dépendre (axiome 4).

Ce programme permet d'étudier l'influence sur ces caractéristiques générales de :

- la variation de paramètres physiques (coefficient d'extinction moléculaire, rendements quantiques, températures).
- la variation de structure du graphe.

Entrées du programme. -

N nombre entier représentant le nombre des espèces constituant le graphe étudié.

EPS coefficients d'extinctions moléculaires des espèces à la longueur d'onde d'irradiation (en mole/litre. cm).

QU rendements quantiques - QU (I , J) est le rendement quantique de transformation d'une espèce J en l'espèce I . QU(I , I) est le rendement quantique de l'espèce I se transformant en une espèce extérieure au graphe.

TH coefficients d'échanges thermiques d'une espèce J en une espèce I à la température étudiée TH (I , J).

FLU Valeur du flux de photons en ph/cm^2/sec.

Sorties du programme.

F Matrice des fonctions d'interactions.
F(I, J) correspond au chemin de J vers I.
F(I, I) correspond à la fonction extérieure appliquée à l'espèce I.

A Matrice d'évolution.

VP, VPI Partie réelle et partie imaginaire des valeurs propres du système données dans un ordre quelconque, en double précision.

VP(IM) Partie réelle de la plus petite valeur propre en valeur absolue.

VECT Vecteur propre correspondant à la valeur propre précédente, en double précision.

3.3. - PARTIE EXPERIMENTALE : SEPARATION ET DOSAGE DES ISOMERES. -

3.3.1. - Techniques d'irradiation. -

Les solutions d'ergostérol sont irradiées par des radiations ultraviolettes de longueur d'onde 2537 Å, facilement absorbées par la matière ; il est donc nécessaire d'utiliser un solvant et un dispositif d'irradiation possédant tous deux une absorption négligeable pour cette radiation.

Le solvant que nous avons uniquement employé est l'oxyde d'éthyle, de pureté 99,5 % ; ce produit est un des meilleurs solvants de l'ergostérol.

Les solutions d'ergostérol dans l'oxyde d'éthyle (5g/l) sont irradiées dans des ampoules de quartz, type Ultrasil, de 50 millimètres de diamètre et de 30 millimètres d'épaisseur. L'absorption ultraviolette de la paroi, d'épaisseur 1 millimètre, est nulle pour les longueurs d'onde supérieures à 2300 Å.

En cours d'irradiation, les solutions sont agitées en permanence par un aimant enrobé de Téflon, placé à l'intérieur des ampoules et entraîné par un agitateur magnétique tournant à grande vitesse.

Il est important d'éviter le passage thermique de la prévitamine à la vitamine D_2 puisque ce dernier corps est extérieur au graphe vrai.

Un dispositif a donc été mis au point (fig. 16) pour que, pendant l'irradiation, les températures de la solution irradiée et des parois de l'ampoule soient comprises entre 1° et 3°C ; la formation de vitamine D_2 est alors nulle.

L'ampoule d'irradiation est placée dans un récipient rempli d'eau bi-distillée, transparente aux radiations de 2537 Å. Un refroidisseur à effet Peltier, avec régulation, permet d'obtenir à l'intérieur du récipient, des températures variant entre 1 et 3°C. Deux thermocouples, en cuivre constantan, reliés à un enregistreur, sont placés sur la paroi

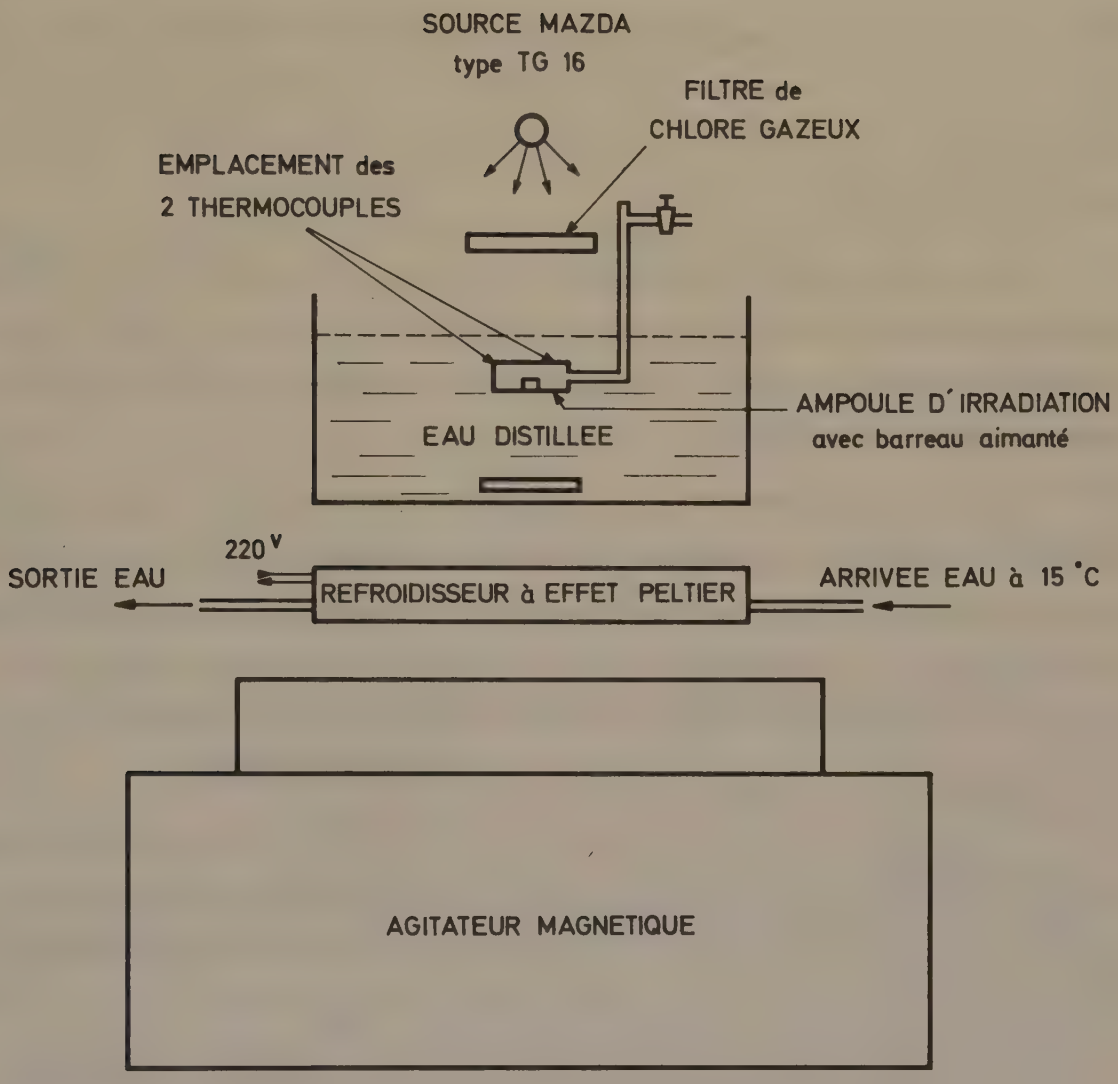

SOURCE MAZDA
type TG 16
FILTRE de
CHLORE GAZEUX
EMPLACEMENT des
2 THERMOCOUPLES
AMPOULE D'IRRADIATION
avec barreau aimanté
EAU DISTILLEE
220 V
SORTIE EAU
REFROIDISSEUR à EFFET PELTIER
ARRIVEE EAU à 15 °C
AGITATEUR MAGNETIQUE

Fig. 16

la plus proche de la source ultraviolette ; ils indiquent en permanence la température en deux endroits différents de cette paroi.

L'ampoule d'irradiation présente une tubulure latérale munie d'un raccord quartz-pyrex-acier inoxydable ; sur ce raccord, nous avons soudé un dispositif métallique à 2 voies ; une voie permet, par l'intermédiaire d'un robinet, de dégazer la solution avant l'irradiation ; l'autre voie, constituée d'un raccord type Swagelok 1/4'' , permet d'effectuer les prélèvements, à l'aide d'une seringue, à travers une pastille en silicone, pendant l'irradiation.

La méthode d'analyse que nous avons utilisée (chromatographie en phase gazeuse) pour obtenir la composition relative, en régime permanent d'évolution, est ainsi effectuée sans changer les conditions internes du milieu irradié.

Les valeurs relatives à la valeur propre minimum λ_m , mesurées par la spectrophotométrie ultraviolette, sont obtenues en irradiant successivement des solutions d'ergostérol, de prévitamine de lumistérol$_2$ et de tachystérol$_2$ directement dans des cuves de spectrophotomètre. Ces cuves ont un parcours optique de 10 mm et leurs parois n'absorbent pas les rayonnements de longueurs d'onde supérieures à 1900 Å.

La transparence du solvant et des parois aux rayonnements ultraviolets de longueurs d'onde supérieures à 2500 Å permet d'employer des lampes à vapeur de mercure à haute et à basse pression pour produire les effets d'isomérisations photochimiques de l'ergostérol.

La source utilisée, pour l'étude des compositions relatives et de la valeur propre minimum λ_m , est une source à vapeur de mercure à basse pression, type Mazda TG16, munie d'un filtre de chlore gazeux à 2 atmosphères ; ce filtre absorbe la raie d'émission de longueur d'onde 3130 Å mais il est transparent pour la radiation de longueur d'onde 2537 Å ; cette dernière radiation est émise avec une pureté de 99,95 % (10).

L'analyse qualitative, par chromatographie en phase gazeuse et sur colonne, nécessite des quantités suffisantes de chacun des isomères ; deux types de sources ultraviolettes sont employées à cet effet.

Une solution d'ergostérol est irradiée (10 g/l) avec la source à vapeur de mercure à basse pression, décrite ci-dessus ; le rayonnement émis par cette source favorise la production de tachystérol$_2$, peu absorbé par la radiation de 2537 Å.

Une seconde solution d'ergostérol, de même concentration, est irradiée avec une source à vapeur de mercure à haute pression, munie d'un filtre à eau distillée atténuant le rayonnement infrarouge et d'un filtre type MTO - J280 a. Le spectre d'émission, après le passage de ces deux filtres, est donné figure 17. Il favorise la production de lumistérol$_2$ au détriment de celle du tachystérol$_2$, très absorbé par les radiations de longueurs d'onde supérieures à 2750 Å (14). Les deux solutions sont alors mélangées et elles contiennent les quatre isomères en quantités suffisantes pour l'analyse qualitative.

3.3.2. - Méthodes utilisées pour la séparation des isomères photochimiques.-
Insuffisances des méthodes décrites au paragraphe 2.2.-

Nous avons utilisé les méthodes d'analyses chromatographiques pour la séparation et le dosage des isomères photochimiques de l'ergostérol.

Chaque méthode a nécessité des travaux importants de mise au point, les données fournies par la littérature étant non seulement insuffisantes mais pessimistes puisque une seule méthode sur les trois que nous avons utilisées devait permettre une séparation suffisante.

La première méthode d'analyse que nous avons essayée, la chromatographie sur couche mince, est surtout une méthode d'analyse qualitative. Décrite ci-dessous, elle a permis une séparation suffisante de cinq isomères (ergostérol, lumistérol$_2$, tachystérol$_2$, prévitamine et vitamine D_2).

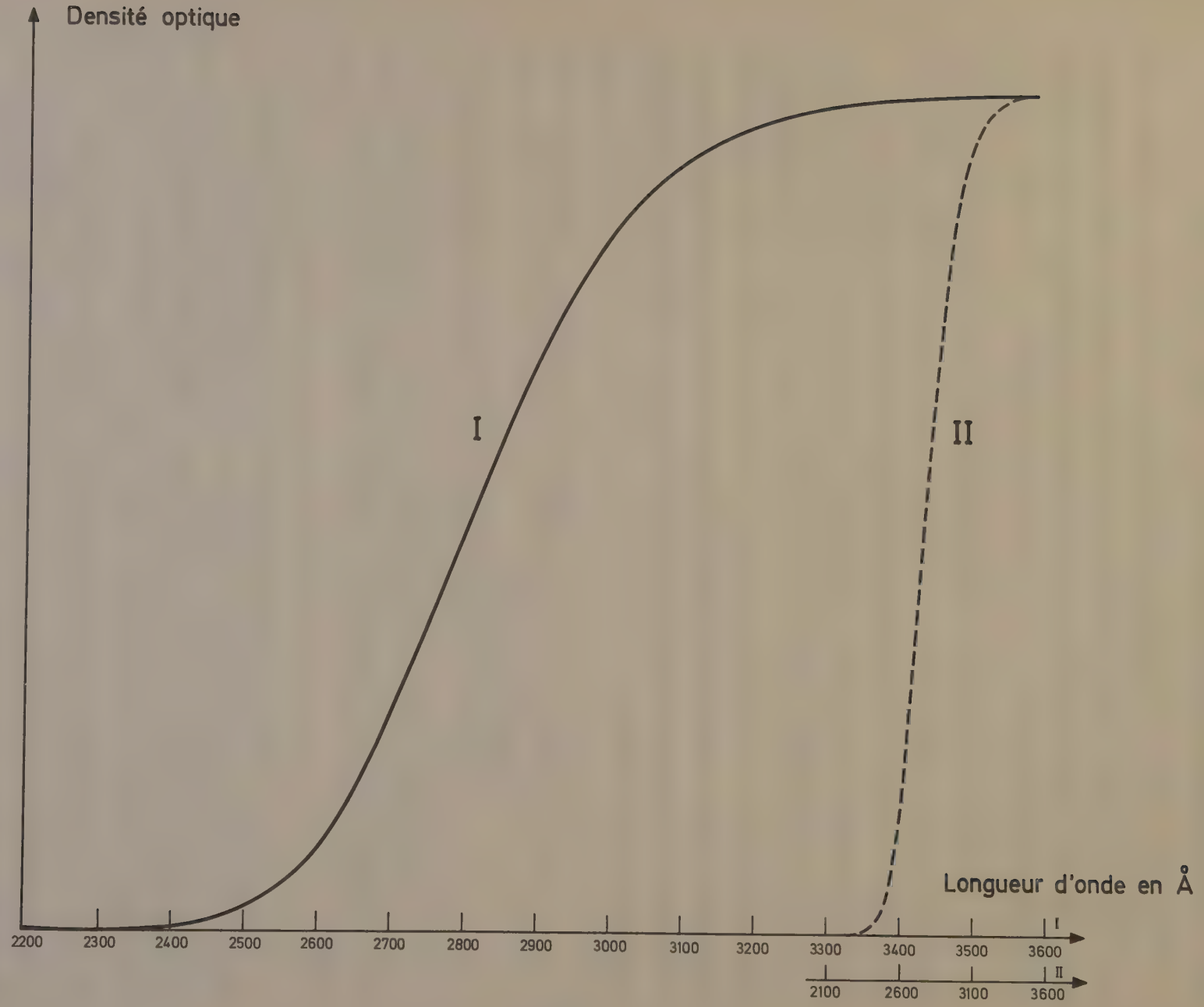

Densité optique
I
II
Longueur d'onde en Å
2200
2300
2400
2500
2600
2700
2800
2900
3000
3100
3200
3300
3400
3500
3600
I
II
2100
2600
3100
3600

Fig. 17

La seconde méthode que nous avons essayée, la chromatographie sur colonne, n'a jamais, d'après la littérature (24) (25), donné de bons résultats, trois isomères seulement ayant été séparés par cette méthode.

Nous utilisons comme solvant d'élution, le même solvant que celui utilisé dans l'irradiation ; nous avons ainsi obtenu la séparation de cinq isomères. L'avantage de cette méthode est qu'elle ne fait intervenir aucune action sur le milieu irradié.

La dernière méthode que nous avons employée, la chromatographie en phase gazeuse, nécessite une analyse qualitative très poussée des différents isomères avant d'être utilisée pour l'analyse quantitative du milieu d'irradiation.

Par cette méthode, nous avons séparé huit isomères, à l'état libre, sur colonne polaire, alors que la littérature (26) (27) ne fait état que de la séparation de quatre isomères.

Les méthodes d'analyse utilisées par nos prédécesseurs (et décrites au paragraphe 2. 2) font intervenir des actions chimiques parfois complexes et d'ailleurs différentes pour le dosage de chaque isomère ; ceci amène à commettre des erreurs sur la composition réelle du milieu d'irradiation.

Par contre, la méthode (chromatographie en phase gazeuse) que nous avons utilisée, permet l'analyse qualitative et l'analyse quantitative des espèces pendant l'irradiation, sans intervenir en aucune façon sur la composition réelle du milieu irradié.

a) Chromatographie sur couche mince. -

1) Technique expérimentale.

Préparation des solutions.

Les solutions d'ergostérol dans l'oxyde d'éthyle (5 g/l) sont irradiées dans des cuves en quartz , par deux lampes germicides Mazda type TG16, à la longueur d'onde de 2537 Å et à une température inférieure à 20°C.

Pour obtenir des solutions étalons différentes, deux solutions d'ergostérol, initialement identiques, sont irradiées respectivement pendant des durées de 2h30 et de 15h ; nous obtenons ainsi deux solutions qui diffèrent par leur concentration en isomère.

Pour la longueur d'onde utilisée, la production de lumistérol$_2$ est minime car ce corps est absorbé par la radiation incidente, nous avons donc ajouté aux deux solutions d'ergostérol irradié, une solution à 1 g/l de lumistérol$_2$ dans l'oxyde d'éthyle.

La pureté des solutions est controlée par chromatographie en phase gazeuse.

Préparation des plaques.

Nous avons utilisé trois types de plaques :

- plaques d'oxyde d'aluminium type E (Merck réf. 5713) - épaisseur 250 µ
- plaques d'oxyde d'aluminium type T (Merck réf. 1065) - épaisseur 1 mm
- plaques de Kieselgel (Merck réf. 5715) - épaisseur 250 µ

Les plaques sont activées par un chauffage de trois heures à 115° et elles sont dégarnies par grattage de la couche sur une largeur de 15 mm, de chaque côté, afin de réduire l'effet de bord (obtention de fronts incurvés).

Solvants.

Des essais ont été effectués sur un vingtaine de solvants ou couples de solvants.

Nous avons retenu les quatre couples de solvants qui nous donnaient les meilleures séparations :

I. Chlorure de Méthylène - Acétate d'éthyle (14 : 4) pour les plaques type T - Al_2O_3

II. Tétrachlorure de Carbone - Acétone (10 : 1) pour les plaques type T - Al_2O_3 et pour les plaques de Kieselgel.

III. Benzène - Acétone (9 : 1) pour les plaques type E - Al_2O_3 et pour les plaques de Kieselgel.

IV. Benzène - Acétate d'éthyle (10 : 2, 5) pour les plaques type E - Al_2O_3.

Dépôt des spots.

Les solutions sont déposées à 30 mm du bord inférieur des plaques, sous forme de spots contenant entre 10 et 20 µg de produit.

Les cuves ne comportent pas de papier filtre pour la saturation ; la séparation des isomères est effectuée avec une vitesse de migration du mélange de solvants plus lente que celle obtenue avec une cuve saturée. On obtient, en effet, des séparations différentes si l'on modifie le degré de saturation d'une cuve de développement puisque l'on agit sur la vitesse de l'éluant et, par suite, sur les vitesses d'entrainement des solutés.

Une circulation d'eau autour des cuves permet d'obtenir des températures intérieures de l'ordre de 20°C. Ce facteur intervient, d'après Singh (28) et d'après nos propres essais.

Révélateur.

Une solution à 20 % de Trichlorure d'antimoine dans le chloroforme est pulvérisée sur les plaques après développement.

Un chauffage à l'air chaud, pendant une minute environ, est suffisant pour révéler ensuite les différents isomères avec leurs teintes correspondantes (Tableau IV).

Tableau IV

Isomère	Teinte
Ergostérol	Bleue
Lumistérol$_2$	Framboise
Tachystérol$_2$	Marron foncé
Prévitamine	Marron clair
Vitamine D$_2$	Marron clair
Suprastérols$_{I \text{ et } II}$ ...	Marron clair

Résultats expérimentaux.

Le Tableau V indique les valeurs de R_F des différents isomères, pour une expérience type, et pour la solution d'ergostérol irradiée 2h30, avec addition d'une solution de lumistérol$_2$ et de vitamine D_2 dans l'oxyde d'éthyle.

Tableau V

	Plaques Al_2O_3 type T - Réf. 1065		Plaques Al_2O_3 type E - Réf. 5713		Plaques Kieselgel Réf. 5715	
Ergostérol	0,38	0,34	0,17	0,38	0,45	0,49
Vitamine D_2	0,51	0,47	0,27	0,51	0,59	0,60
Tachystérol$_2$	0,63	0,55	0,33	0,58	0,62	0,62
Lumistérol$_2$	0,68	0,62	0,52	0,67	0,70	0,68
Prévitamine	0,74	0,71	0,57	0,72	0,78	0,75
Solvants	I	II	III	IV	II	III

Le rapport frontal R_F caractérise le degré de séparation d'une substance et il est défini par le rapport : $\frac{\text{distance parcourue par une substance}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$

les distances sont mesurées entre le point d'application et le centre de la substance révélée.

Nous avons ensuite déposé les deux solutions irradiées, avec addition de la solution de lumistérol$_2$, non plus sous la forme de spots mais sous la forme de traits. Nous utilisons pour cela une pipette terminée par un capillaire.

Les plaques utilisées sont en Kieselgel (Merck réf. 5715) de 250 μ d'épaisseur. En utilisant le mélange II de solvants (tetrachlorure de carbone - acétone (10 : 1)), il a été possible, après développement,

de gratter les bandes formées, des les éluer par l'oxyde d'éthyle et, après filtration sur papier filtre Durieux prélavé, d'obtenir les spectres ultraviolets des principaux isomères.

Ces spectres sont identiques à ceux donnés par Shaw et Jefferies (29), (figure 18).

Différents essais ont permis de s'assurer de la reproductibilité des résultats. En utilisant des couches de 2 mm d'épaisseur, nous avons pu isoler suffisamment de produit pour procéder à des identifications précises en chromatographie en phase gazeuse et obtenir les temps de rétention propres à chaque isomère.

Interprétation des résultats.

Le Kieselgel ne permet que difficilement la séparation de la vitamine D_2 du tachystérol$_2$, mais, par contre, le lumistérol$_2$ est nettement séparé de la prévitamine.

Avec l'oxyde d'aluminium, type E, les résultats sont inversés par rapport à ceux obtenus avec le Kieselgel ; on obtient une bonne séparation de D_2 et T et non de L et P.

Les meilleures séparations sont, en fait, obtenues pour les cinq isomères, avec l'oxyde d'aluminium type T (fig. 20).

Si les irradiations sont effectuées à des températures inférieures à 20°C, le passage de la prévitamine à la vitamine D_2 est exclu et les quatre isomères formés peuvent être étudiés sur Kieselgel.

Les spectres ultraviolets obtenus sur les produits séparés par chromatographie sur couche mince de 250μ, et non de 2 mm, sont donnés pour des solutions d'ergostérol irradiées pendant 2h30 (fig. 18).

Les spectres obtenus pour des durées d'irradiation de 15 heures, toujours avec addition d'une solution de lumistérol$_2$ sont donnés en fig. 19.

On constate deux différences dans les spectres présentés dans les figures 18 et 19. L'ergostérol n'apparaît pas dans la figure 19 car il n'existe plus qu'en très faible quantité, ce que confirme la chromatographie en phase gazeuse.

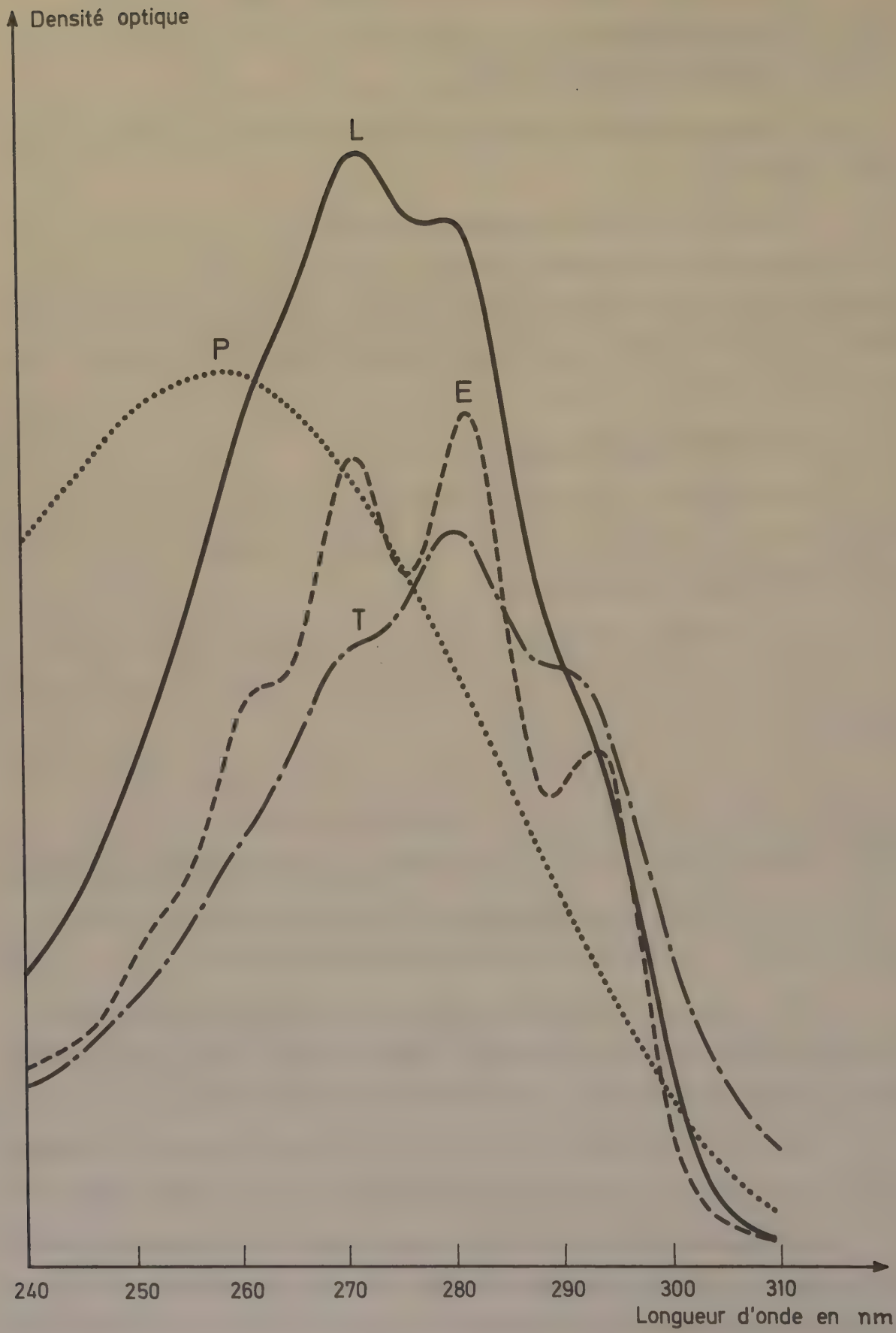

Densité optique
L
P
E
T
240
250
260
270
280
290
300
310
Longueur d'onde en nm

Fig. 18

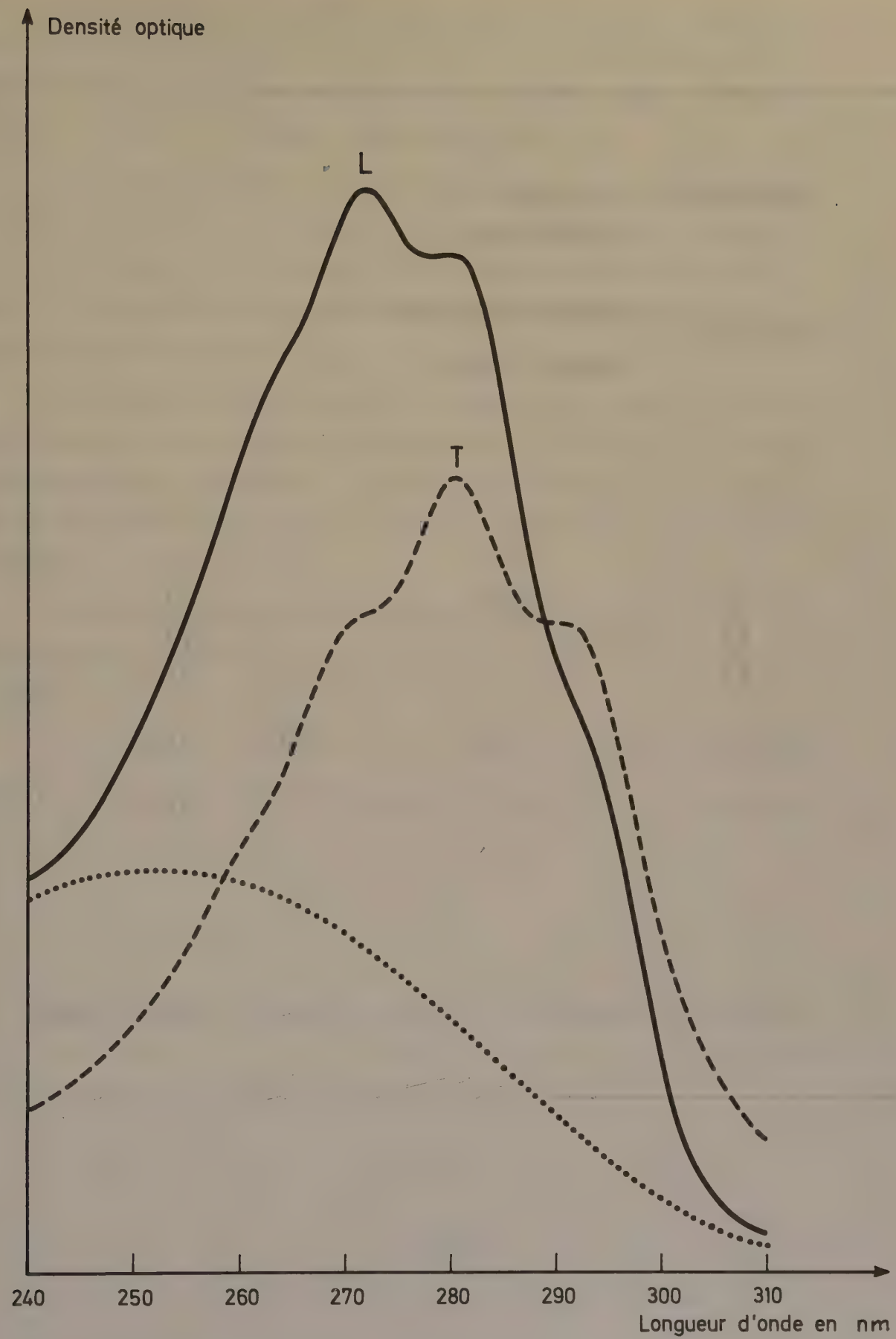

Densité optique
L
T
240
250
260
270
280
290
300
310
Longueur d'onde en nm

Fig. 19

ABSORBANT : Al_2O_3 type T
réf. Merck 1065

SOLVANTS { Chlorure de Méthylène : 14
Acétate d'éthyle : 4

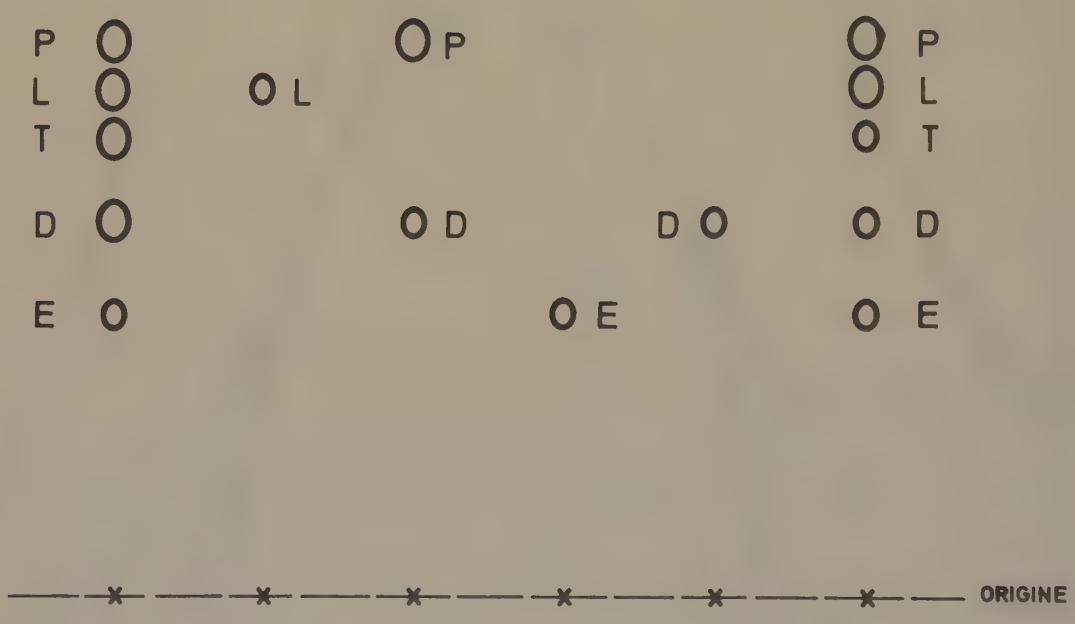


Fig. 20

D'autre part, nous n'obtenons plus le spectre de la prévitamine dont le maximum d'absorption est à 2600 Å mais un nouveau spectre, révélant la formation d'un nouvel isomère, dont le maximum d'absorption est à 2520 A, comme le toxistérol$_2$A (34).

La méthode décrite ci-dessus nous a permis d'obtenir les spectres ultraviolets par l'élution des bandes formées sur couches minces de 250 μ ; cette méthode s'est révélée également convenable pour l'étude des isomères photochimiques du 7-dehydrocholesterol, précurseur de la vitamine D_3.

On constate d'ailleurs que les valeurs de R_F pour le 7-déhydrocholestérol, la prévitamine et le tachystérol$_3$ sont identiques à celles des isomères de l'ergostérol, avec des couches Kieselgel réf. 5715 et les mélanges de solvants II et III : (tétrachlorure de carbone - Acétone 10 : 1 et benzène - acétone 9 : 1).

La méthode chromatographique sur couche mince, qui n'a été que peu appliquée à l'étude qualitative des isomères de l'ergostérol nous semble pourtant très bien adaptée à ce problème.

Le tableau VI donne les valeurs de R_F obtenues par les différents auteurs ayant utilisé cette méthode chromatographique.

	M. Bogolovski (30)		M. Kobayashi (31)		MM. Norman (24) De Luca	Nos résultats		G. M. Sanders (10) Isomères du 7-dehydrocholestérol
	Al_2O_3	Silicagel + NO_3Ag type KSK	Al_2O_3 type G	Silicagel Kieselgel G	Silicagel Cab - O - Sil Silica gel	Al_2O_3 type T	Silicagel réf. 5715	Kieselgel G
Ergostérol	0,31	0,38	0,35	0,29	0,27	0,38	0,45	0,41
Vitamine D_2	0,38	0,67	0,40	0,35	0,33	0,51	0,59	0,50
Tachystérol$_2$	0,43	0,77	0,40	0,35	0,46	0,63	0,62	0,52
Lumistérol$_2$	0,53	0,34	0,47	0,40	/	0,68	0,70	0,61
Prévitamine	0,59	0,85	/	/	/	0,74	0,78	0,70
Solvants	cyclohexane 1 ether 4	chloroforme 96 méthanol 4	Hexane 10 Methylethylcétone 2	Hexane 10 Methylethylcétone 2	Hexane 90 Acétone 10	Chlorure méthylène 14 Ethyl Acétate 4	tétrachlorure 10 carbone Acétone 1	Benzène 90 Acétone 10

Tableau VI

b) Chromatographie sur colonne. -

Introduction.

Norman et De Luca (24) utilisent une colonne de 58 x 1, 5 cm remplie avec 24 grammes d'acide silicique Bio-Rad - granulométrie 325 mesh - dans l'hexane redistillé. L'élution est effectuée avec un mélange éther éthylique - n -hexane (10 : 90). Ils concluent que la séparation de la vitamine D_2 , du tachystérol$_2$ et de l'ergostérol a pu être réalisée.

Shaw et Jefferies (32) emploient une colonne de 55 x 1,4 cm, remplie d'alumine activée, avec l'acétone à 6 % dans le pétrole léger (B. P. 40° à 60°C) comme agent éluant. Ils obtiennent trois bandes ; la première contient la prévitamine et le lumistérol$_2$, la seconde le tachystérol$_2$ et la vitamine D_2 , la dernière l'ergostérol.

Kobayashi (25) utilise une colonne de 25 x 2 cm, garnie de 80 grammes d'alumine (Merck réf. 1097) sans aucun prétraitement. Deux méthodes d'élution sont employées, l'une en continu avec le mélange hexane-éther (2 : 1) uniquement, l'autre graduelle avec les mélanges successifs : hexane-éther (4: 1) , hexane-éther (3 : 1) et hexane-éther (2 : 1). Le lumistérol$_2$, le tachystérol$_2$ et l'ergostérol sont séparés, dans cet ordre, par la première méthode d'élution. Kobayashi suppose que l'élution de la prévitamine dont il ne possédait pas d'échantillon, doit se manifester au voisinage de l'ergostérol. Nous verrons ci-dessous, qu'au contraire, la prévitamine est éluée avec le lumistérol$_2$, ces deux isomères étant les plus difficilement séparables par les méthodes chromatographiques, sur colonne ou en phase gazeuse. Ils sont, par contre, très bien séparés l'un et l'autre de l'ergostérol.

Description de l'appareillage utilisé dans ce travail.

L'appareil, commercialisé par la Société Seive *, comporte une cuve à circulation en quartz, située entre un monochromateur à

---

* Société Seive - Chemin de la Gommerie, Rambouillet - 78.

réseau réglable électroniquement sur deux longueurs d'onde différentes entre 2000 et 7000 Å et un photomultiplicateur. La source utilisée est une lampe à deuterium. La concentration est une fonction linéaire de la densité optique δ qui peut varier dans le domaine de 0 à 2 pour des cuves à circulation de 10 mm de parcours optique et de 0 à 4 pour des cuves de 5 mm. On peut également utiliser des cuves de 2 et 1 mm pour les produits absorbant fortement ou une cuve de 20 mm pour les très faibles concentrations.

Le collecteur de fractions comporte 185 tubes et le changement de tubes est effectué électroniquement, soit par présélection de la durée de prélèvement d'un échantillon dans un tube donné, soit par comptage de gouttes, soit par volume constant.

Une enceinte réfrigérée est utilisée pour recevoir le collecteur de fractions, la cuve à circulation, le photomultiplicateur et une colonne de longueur maximum 1 mètre.

Tous nos essais ont été effectués avec les réglages suivants :

- Longueurs d'onde choisies près des maximum d'absorption des composés : 2700 et 2800 Å.
- Largeur de fente du monochromateur : 0,6 mm.
- Changement de tubes par présélection de la durée de prélévement dans un tube donné : toutes les dix minutes.
- Vitesse de déroulement du papier enregistreur : 60 mm/h.
- Température de l'enceinte réfrigérée : 10°C.
- Domaine de mesure des densités optiques : 0 à 4.

Résultats expérimentaux.

Les premiers essais, effectués suivant la méthode indiquée par Kobayashi, n'ont pas permis, malgrè l'emploi de différents solvants et de colonnes de longueurs et de diamètres variables, de séparer la prévitamine et lumistérol$_2$. (fig. 21)

L'emploi de colonnes de 56 x 1 cm et de colonnes de diamètres décroissants, du type de celles décrites par Fischer et Kabara (33) montrent seulement un épaulement dans le pic de la prévitamine.

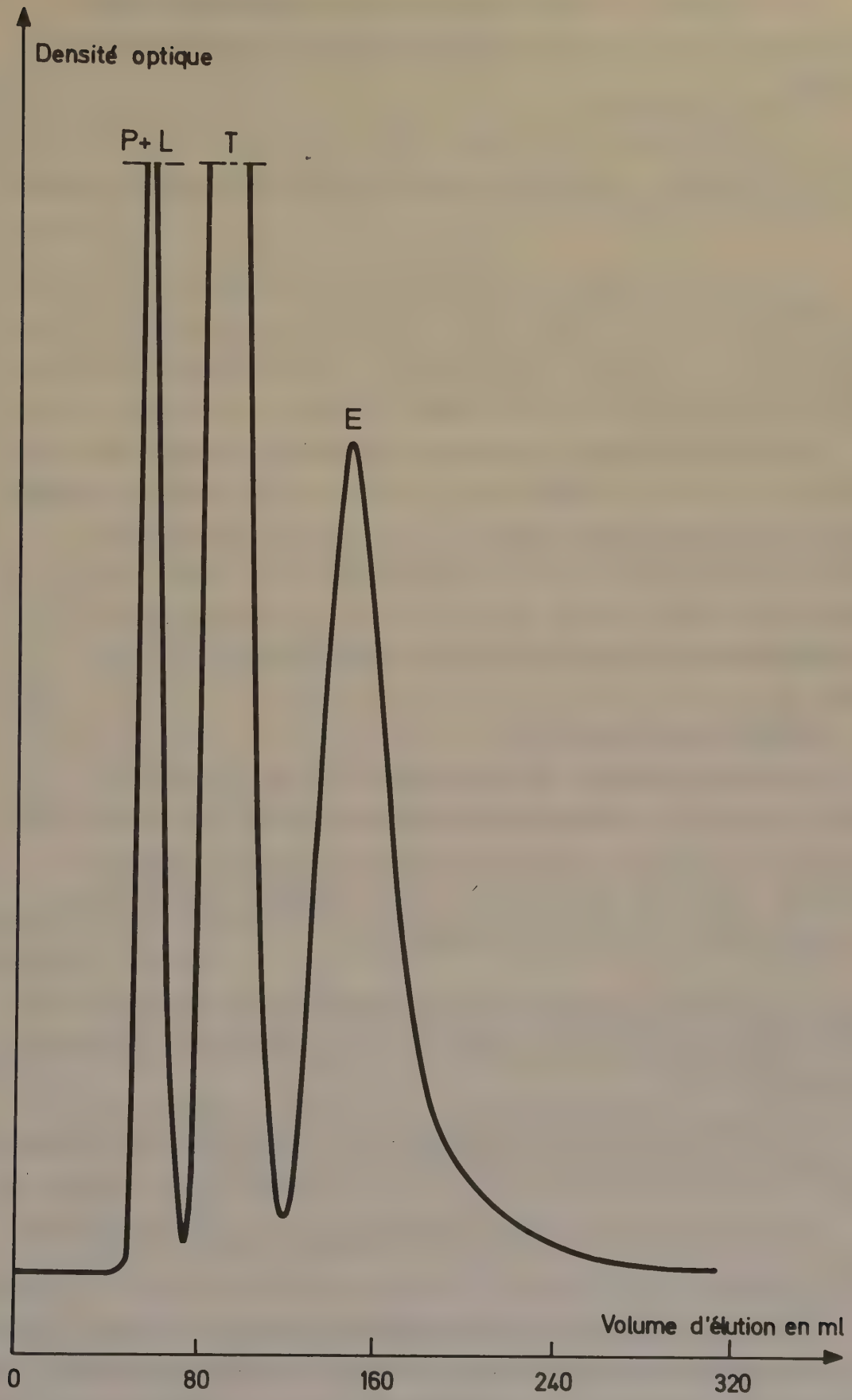


Fig. 21

Par passage en chromatographie en phase gazeuse de l'éluat correspondant à ce pic, on décèle effectivement un mélange prévitamine-lumistérol$_2$.

Les deux autres isomères que nous avons obtenus, nettement séparés (tachystérol$_2$ - ergostérol) se sont révélés chromatographiquement purs.

De nombreux essais, effectués avec des produits de remplissage variés (Florisil, Acide silicique BIO-Sil CW, SIL-R, Al_2O_3, Silicagel ...) de provenances, de granulométries et d'indices de Brockman différents, n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats.

Les essais suivants, concluants, ont alors été conduits de manière que le solvant d'élution soit le même que celui utilisé pour l'irradiation, c'est-à-dire l'oxyde d'éthyle. Ce fait évite le passage d'un solvant à un autre et évite une action extérieure, même faible, sur la composition du milieu irradié. Nous pensons que ce n'est pas une précaution expérimentale superflue car les corps étudiés sont très labiles.

Préparation de la colonne.

La colonne utilisée, de dimensions 60 x 1 cm, munie d'un robinet en téflon précédé d'un tampon de laine de verre, est remplie d'un mélange de 29 grammes de Silicagel contenant 12 % environ d'alumine (SIGMA réf. S 7875), de granulométrie égale ou inférieure à 325 mesh, dans l'oxyde d'éthyle, sans aucun prétraitement.

Le mélange, après une agitation vigoureuse, est versé peu à peu dans la colonne remplie aux trois-quarts d'oxyde d'éthyle seul, le robinet inférieur étant fermé.

Le matériau de remplissage se dépose par gravité, sans aucune occlusion de bulles, jusqu'à une hauteur de 57 cm environ.

L'oxyde d'éthyle surnageant est aspiré entre chaque remplissage partiel.

Une fois l'opération terminée, le robinet inférieur est ouvert, la colonne alimentée en oxyde d'éthyle est laissée telle quelle une ou deux heures pour lui permettre de se stabiliser.

Irradiation de la solution initiale.

Les différents isomères sont obtenus par l'irradiation d'une solution d'ergostérol dans l'oxyde d'éthyle (10 g/l) avec deux sources ultraviolettes différentes :

- une lampe germicide type Mazda TG16, favorisant par son émission à 2537 Å, la production de tachystérol$_2$.
- une source polychromatique à vapeur de mercure à haute pression munie de deux filtres, le premier constitué d'une cuve en quartz remplie d'eau distillée pour réduire le rayonnement infrarouge, le second étant un filtre ultraviolet, type MTO-J280a, absorbant les radiations de courtes longueurs d'onde et, de ce fait, favorisant la production de lumistérol$_2$ (fig. 17).

L'action de ces deux sources est nettement visible sur les figures 22 et 23.

- 1,5 à 2 cm^3 du milieu d'irradiation sont utilisés à chaque chromatographie et les charges correspondantes de 15 à 20 mg, suffisent pour obtenir après quelques chromatographies effectuées avec la même colonne, les quantités nécessaires à l'obtention des spectres infrarouges propres à chaque isomère et à l'étalonnage en phase gazeuse.

L'élution est effectuée à la pression atmosphérique. La consommation nécessaire pour l'élution totale de l'ensemble des isomères est inférieure à 200 cm^3.

La pureté des isomères élués est vérifiée par spectrophotométrie ultraviolette (fig. 18) et par chromatographie en phase gazeuse (fig. 24).
25

Une solution de vitamine D$_2$, ajoutée aux solutions précédentes, est éluée entre le tachystérol$_2$ et l'ergostérol, mais elle est insuffisamment séparée du tachystérol$_2$.

Cette méthode d'analyse pourrait permettre de confirmer les constantes d'équilibre thermique entre la prévitamine et la vitamine D$_2$, ces deux isomères étant nettement séparés (fig. 26) ; ils sont obtenus par un chauffage à l'ébullition, avec reflux, d'une solution de vitamine D$_2$ dans l'alcool éthylique (10 g/l) pendant 1h30.

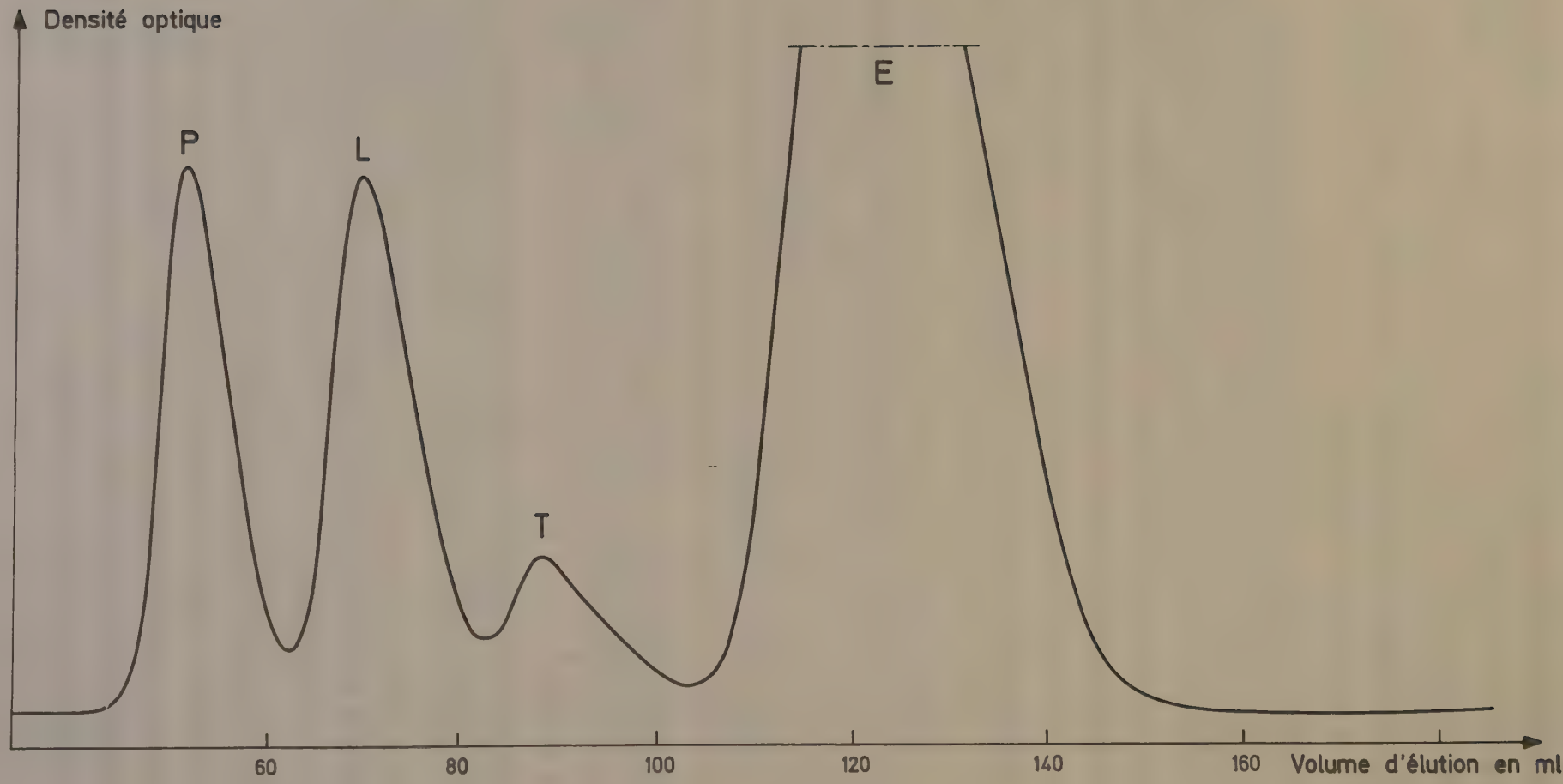

Densité optique
P
L
T
E
60
80
100
120
140
160
Volume d'élution en ml

Fig. 22

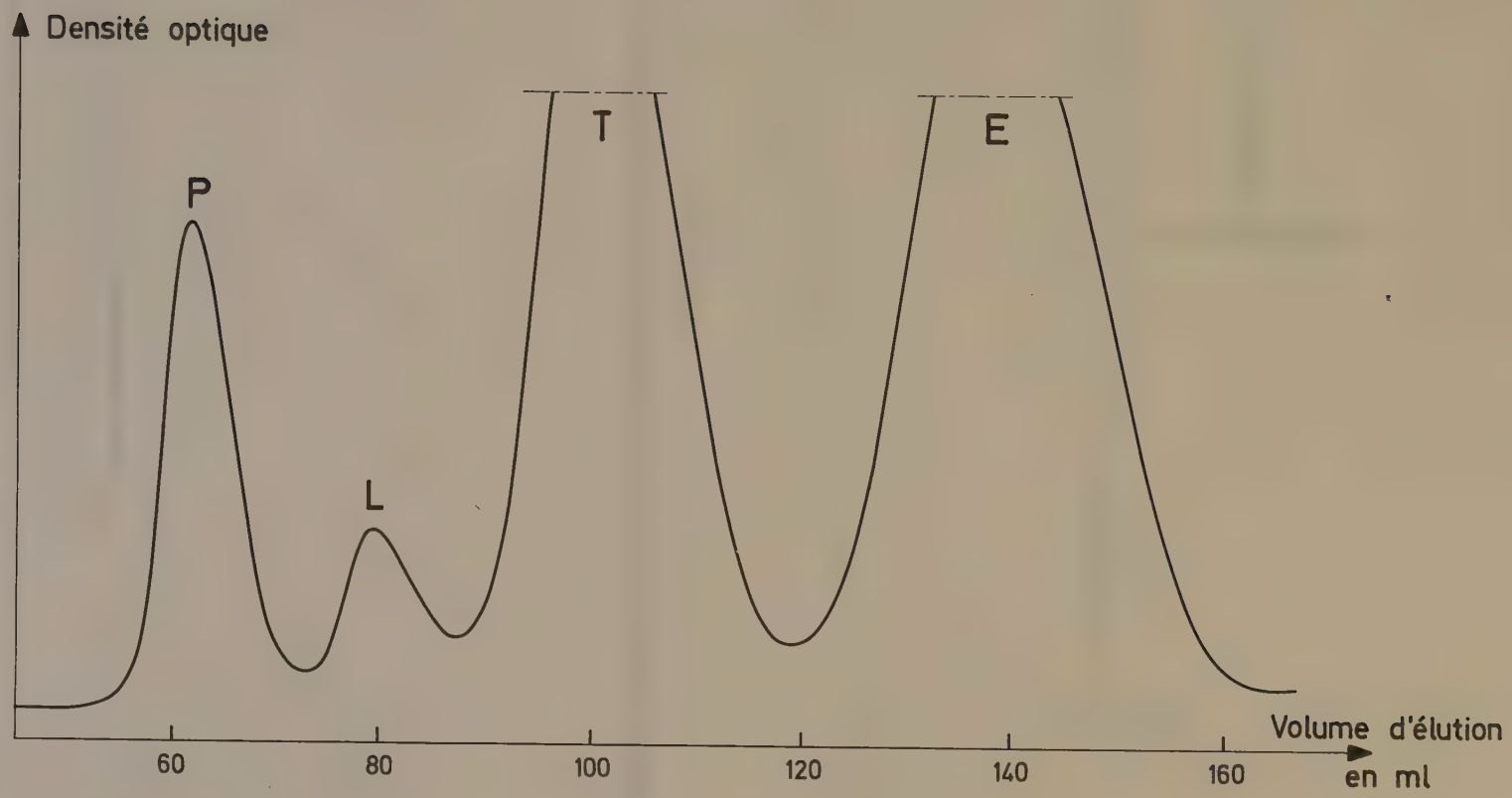

Densité optique
P
L
T
E
60
80
100
120
140
160
Volume d'élution
en ml

Fig. 23

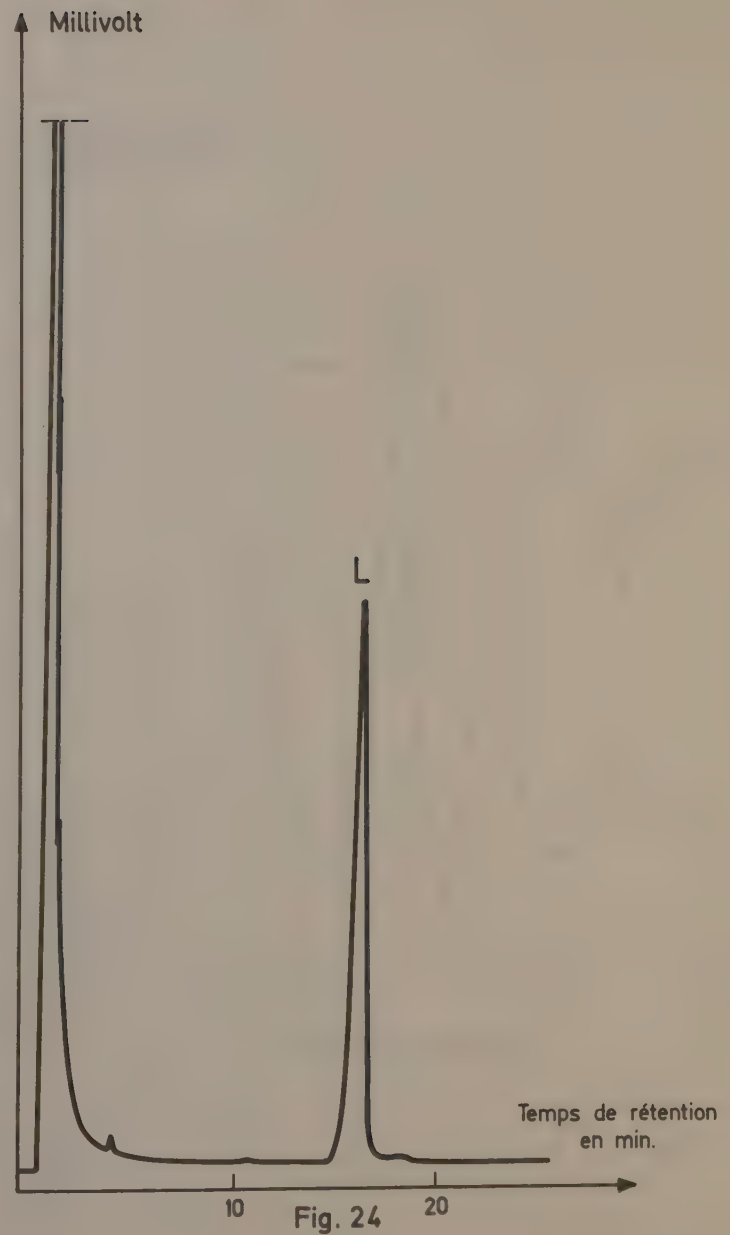

Millivolt
L
Temps de rétention
en min.
10
20

Fig. 24

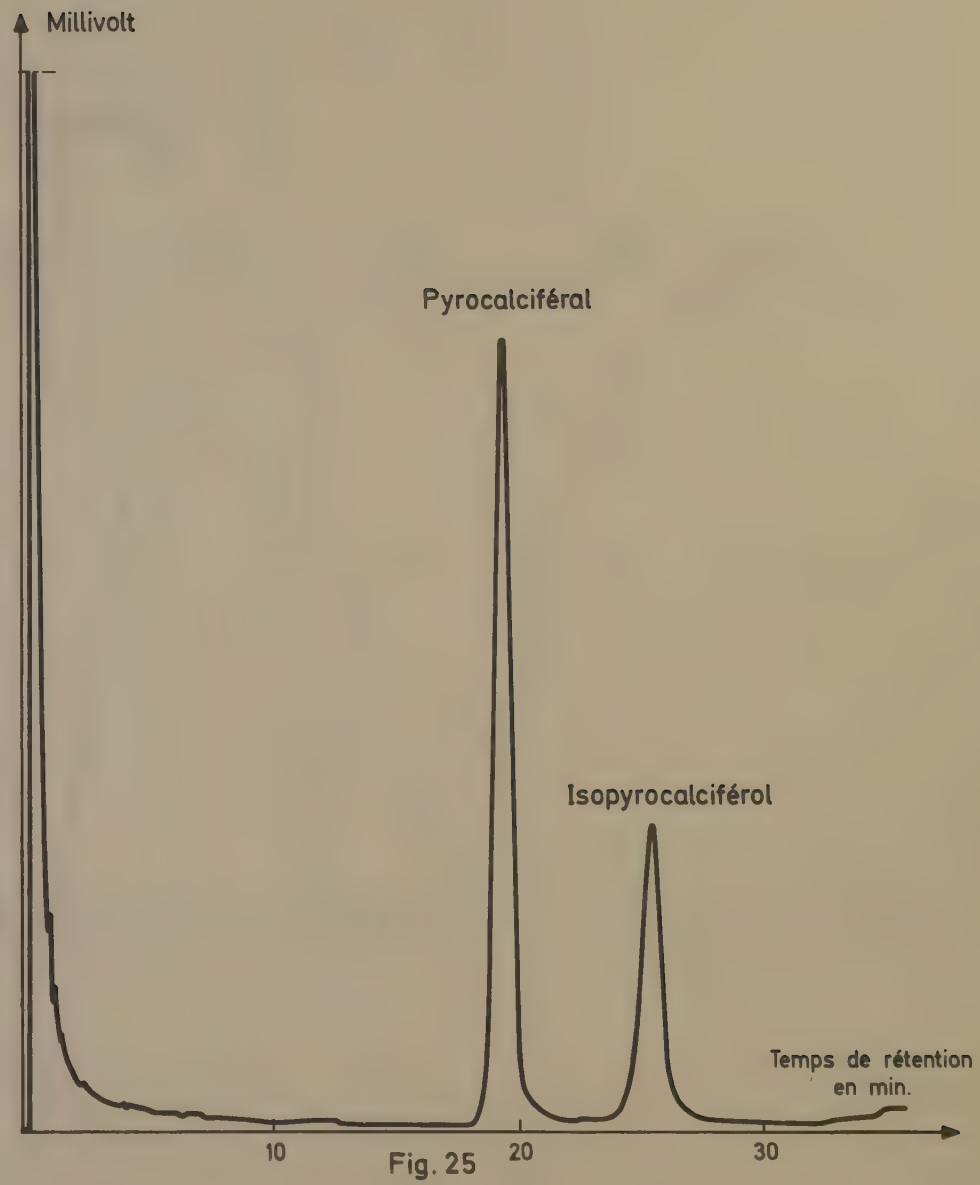

Millivolt
Pyrocalciféral
Isopyrocalciférol
Temps de rétention
en min.
10
20
30

Fig. 25

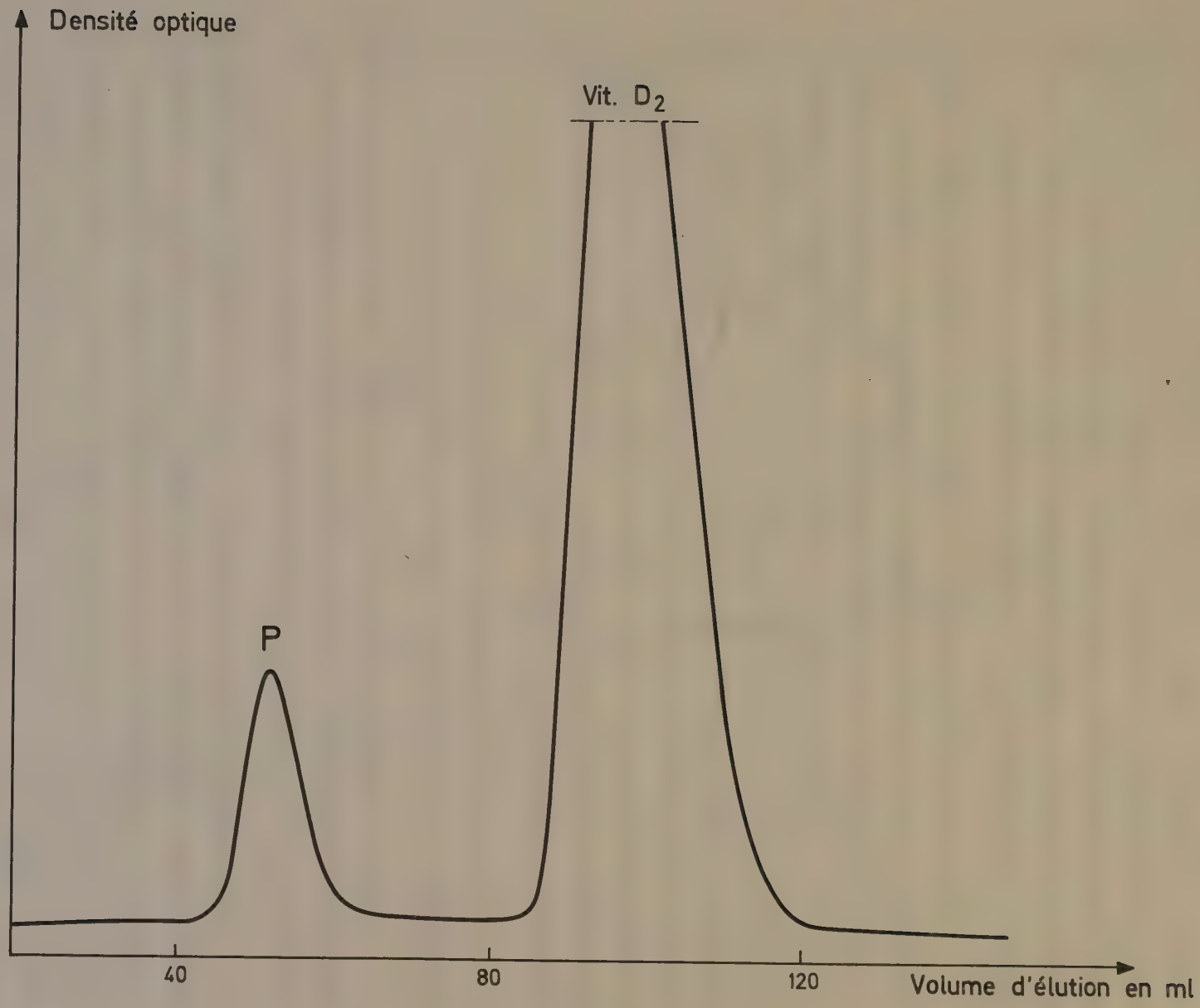


Fig. 26

On constate la présence, dans les solutions d'ergostérol irradiées quelques heures, d'un isomère supplémentaire dont le passage, en spectrophotométrie ultraviolette, de la fraction éluée, donne un spectre ayant un maximum d'absorption situé vers 2500 Å, semblable au spectre du toxistérol$_2$A (34) (fig.27). L'analyse de ce corps, par la chromatographie en phase gazeuse, donne deux pics distincts ; ce fait tiendrait à prouver que cet isomère subit une réaction thermique dans l'injecteur, comme la prévitamine ou la vitamine D_2, et qu'il se transforme en deux isomères.

Pour des solutions fortement irradiées, un autre isomère supplémentaire, difficilement séparable de la prévitamine, a été mis en évidence. Son spectre d'absorption ultraviolette est identique à celui de la figure 19, obtenu par grattage et par élution de la bande correspondant à la prévitamine, en chromatographie sur couche mince. Cet isomère n'ayant pas pu être séparé de la prévitamine, le spectre d'absorption correspond vraisemblablement à un mélange de ces deux corps. L'examen de ce spectre laisse supposer que ce nouvel isomère a également un spectre semblable à celui du toxistérol$_2$A (fig.27). Nous n'avons pas pu déceler la formation photochimique de toxistérol$_2$B (34).

La figure 27 donne les spectres d'absorption ultraviolets de six isomères, séparés sur une colonne de 96 cm x 1 cm.

Si l'on utilise les valeurs des coefficients d'extinction moléculaire donnés par Rappoldt (11), la mesure de la surface des pics permet l'analyse quantitative des différentes espèces dans le milieu irradié.

La méthode décrite ci-dessus a permis (fig.28) la séparation de 5 isomères (dans l'ordre d'élution : toxistérol$_2$A , prévitamine, lumistérol$_2$, tachystérol$_2$ et ergostérol) et la mise en évidence d'un nouvel isomère. Utilisée également avec succès dans l'étude photochimique de la vitamine D_2, puisque nous avons obtenu un nouveau corps, le 5,6 trans-6,7,5 trans-vitamine D_2 ou trans-vitamine D_2, cette méthode présente cinq avantages :

- Aucune action, sauf le pipetage, sur le milieu irradié.
- Possibilité d'utiliser la même colonne plusieurs fois de suite (la figure 29 est obtenue avec une colonne ayant servi 3 fois).

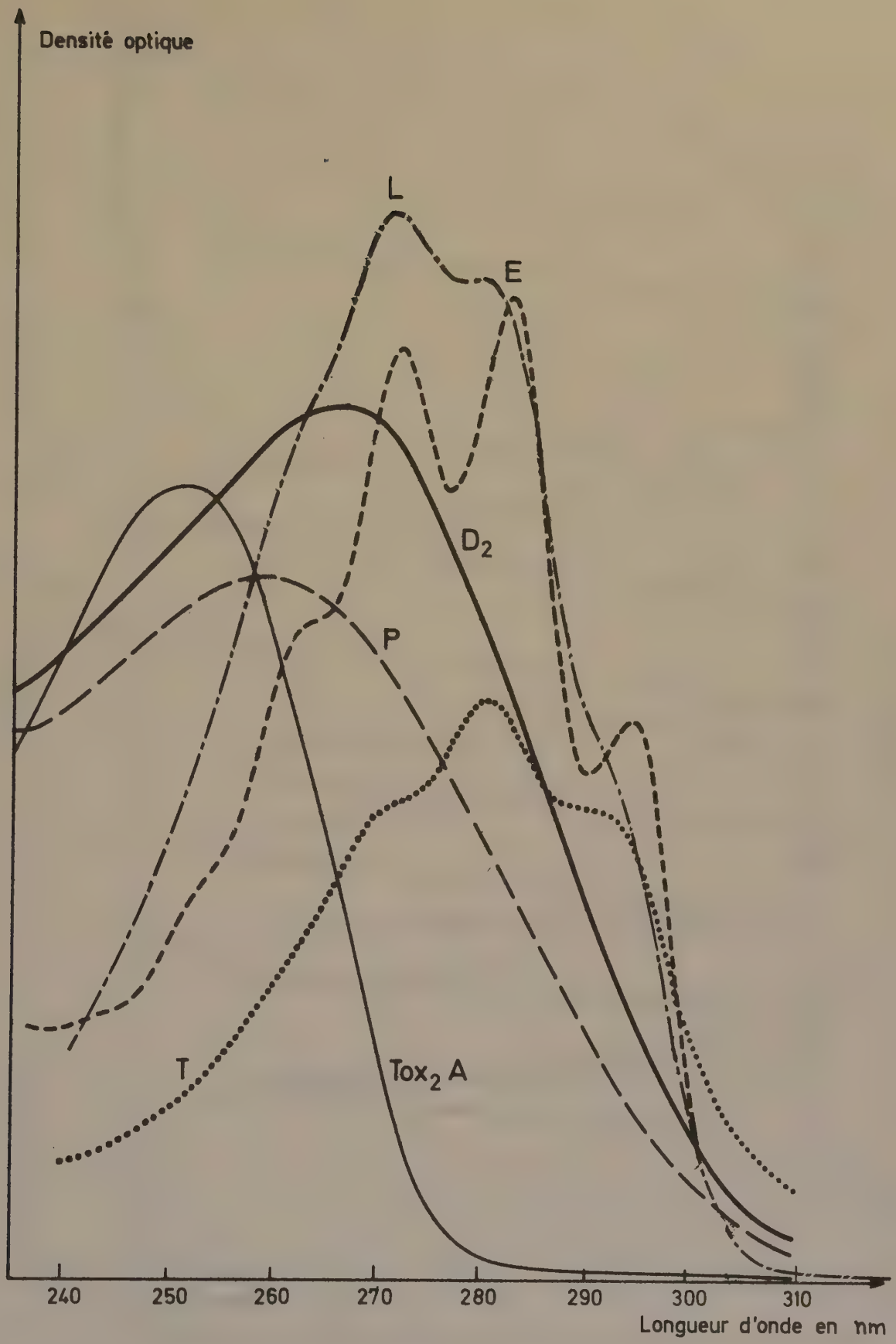

Densité optique
L
E
D2
P
T
Tox2 A
240
250
260
270
280
290
300
310
Longueur d'onde en nm

Fig. 27

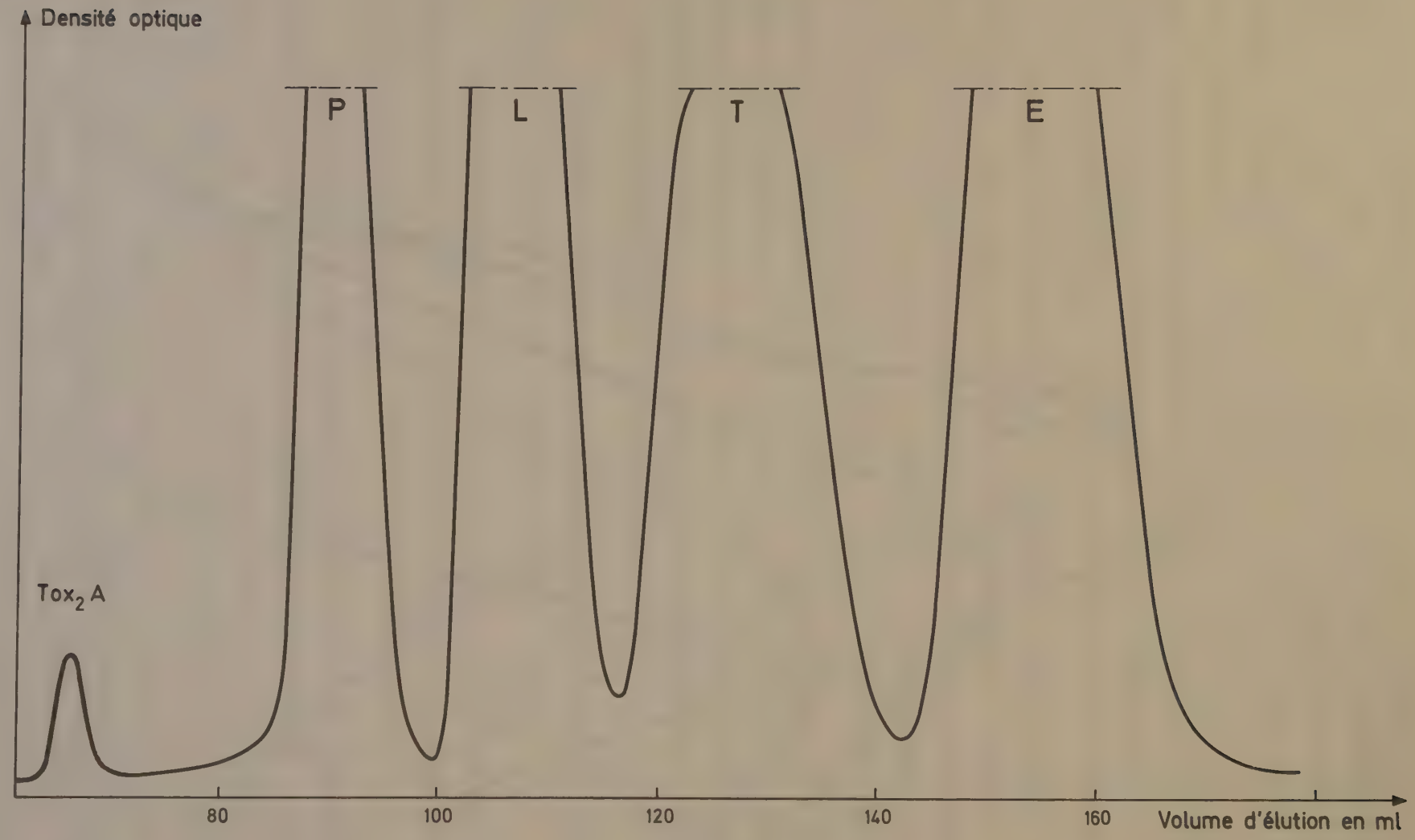

Densité optique
P
L
T
E
Tox2 A
80
100
120
140
160
Volume d'élution en ml

Fig. 28

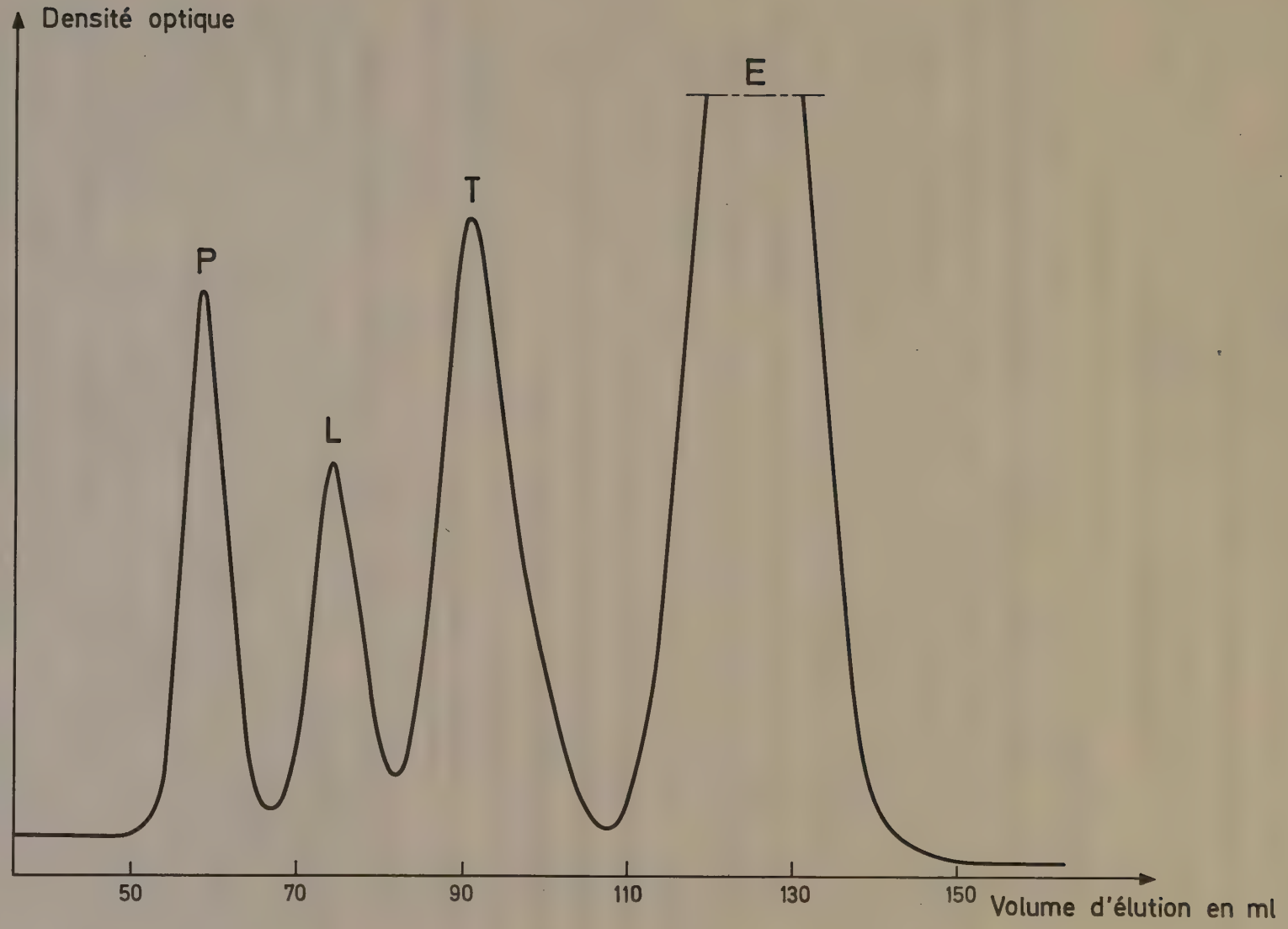

Densité optique
E
T
P
L
50
70
90
110
130
150
Volume d'élution en ml

Fig. 29

- Bonne reproductibilité.
- Très faible consommation de solvant.
- Le solvant utilisé permet une analyse directe en spectrophotométrie ultraviolette dans la zone spectrale d'absorption des différents isomères (2400 Å à 3100 Å).

c) Chromatographie en phase gazeuse.

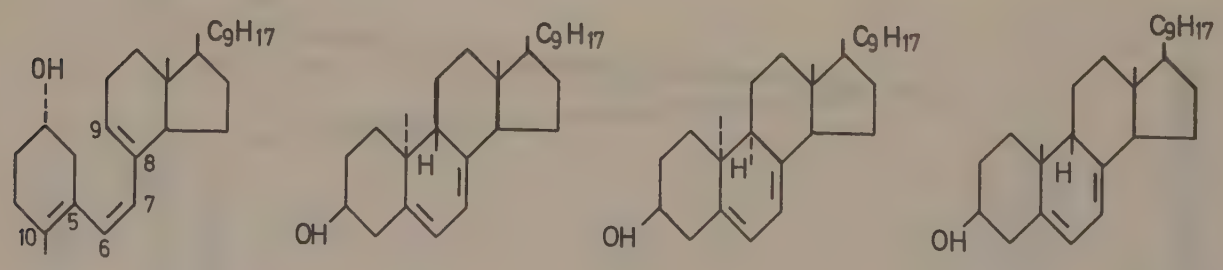
Introduction.

Cette méthode d'analyse a été moins utilisée que les deux méthodes précédentes car elle nécessite, pour la séparation des isomères de l'ergostérol, de poids moléculaire 396,66, l'emploi de températures élevées (supérieures à 210°C) et elle est rendue délicate par la présence de deux isomères supplémentaires, formés thermiquement dans l'injecteur.

L. Velluz (17) (35) (36) a montré que la vitamine D_2 est obtenue uniquement à partir de la prévitamine lorsque celle-ci est soumise à une température supérieure à environ 20°C, sa formation étant d'autant plus rapide que la température utilisée est plus élevée. Pour des températures supérieures à 180°C, la vitamine D_2 se transforme en deux nouveaux isomères : le pyrocalciférol et l'isopyrocalciférol.

$$\text{Prévitamine} \underset{T° > 20°C}{\rightleftharpoons} \text{Vitamine } D_2 \xrightarrow{T° > 180°C} \begin{cases}\text{Pyrocalciférol}\\ \text{Isopyrocalciférol}\end{cases}$$

Les structures de ces isomères sont donnés ci-dessous, ainsi que celle du lumistérol$_2$.



Prévitamine — Lumistérol$_2$ — Pyrocalciférol — Isopyrocalciférol

Les traits épais et continus, indiqués sur les formules ci-dessus,

représentent les groupements β , attachés aux cycles et situés au-dessus du plan général du système. On représente au contraire les groupements α , situés au-dessous du plan, par des traits en pointillés.

Le lumistérol$_2$ et le pyrocalciférol n'ont pas été, à notre connaissance, séparés par cette méthode et nous supposons que ce fait est dû à la même configuration du groupe méthyle en C10.

La méthode de chromatographie en phase gazeuse ne permet pas, non plus, de séparer la prévitamine et la vitamine D_2 , puisque ces deux corps produisent dans l'injecteur les deux mêmes isomères.

On verra ci-dessous que le rapport des concentrations en présence du pyrocalciférol et de l'isopyrocalciférol est constant pour des conditions expérimentales identiques. Le dosage de la prévitamine dans les solutions d'ergostérol irradiées à des températures inférieures à 20°C (dans lesquelles la vitamine D_2 est absente), peut s'effectuer directement par la mesure de la somme de ces deux isomères, ou de l'un d'entre eux seulement.

L'analyse, par cette méthode, des quatre isomères formés par l'irradiation photochimique de l'ergostérol, à une température inférieure à 20°C (prévitamine, lumistérol$_2$, ergostérol , tachystérol$_2$) nécessitera donc, en fait, la séparation plus délicate de cinq espèces (pyrocalciférol, lumistérol$_2$, isopyrocalciférol, ergostérol, tachystérol$_2$).

Ziffer (27) utilise, pour analyser parallélement deux prises d'essais du même mélange initial, deux colonnes ; l'une, apolaire, contenant 0,75 % de SE30 sur gas-chrom P 100/140, à une température de 222°C, l'autre, polaire, contenant 0,75 % de néopentyl glycol succinate sur gas chrom P 100/140 à une température de 210°C. Il n'obtient pas la séparation entre le lumistérol$_2$ et le pyrocalciférol.

Vessman (37) étudie l'analyse quantitative de la vitamine D_2 avec une colonne de 3,4 % de Butanediol Succinate. Un échantillon de vitamine D_2 , dissous dans une solution de cholestérol et de pyridine est estérifié par le mélange Hexamethyldisilazane - Trimethylchlorosilane, puis injecté. L'auteur trouve que le rapport :

$$\frac{\text{Surface Pic Cholestérol TMS}}{\text{Surface Pic Pyrocalciférol TMS}}$$

est constant pour une température de l'injecteur donnée. L'analyse quantitative peut être basée sur ce rapport.

Nair (38) emploie deux colonnes différentes pour l'analyse de la vitamine D_2 et D_3 ; la première est remplie d'un phenyl polysiloxane (SE52), la seconde d'un mélange de SE52 et d'un constituant plus polaire, un cyanoéthyl méthylpolysiloxane (949). Il opère à des températures respectives de 213° et 225°C.

Kobayashi (26) utilise une colonne contenant 1, 5 % de SE 30 sur gas-chrom W 60/80 et des températures "injecteur et colonne" de 250°C et 220°C respectivement. Le support est silanisé pour éviter que l'adsorption des solutés par le support, fréquente pour des taux de phase stationnaire faibles, ne conduise à des anomalies (pics trainants). Il semble, d'après Tranchant (39) que les groupes hydroxyles des composés siliceux soient en partie responsables de cette adsorption. La silanization a donc pour but de remplacer les groupes hydroxyles libres de la surface du support par des groupes silyls ou triméthylsilyls.

Kobayashi ne peut obtenir la séparation du lumistérol$_2$ et du pyrocalciférol et il suggère l'utilisation d'autres méthodes (chromatographie sur colonne, sur couches minces) pour l'identification des isomères de l'ergostérol et de la vitamine D_2.

Résultats expérimentaux de la présente étude.

Les différents isomères nécessaires à l'analyse qualitative sont obtenus par l'irradiation dè solutions d'ergostérol avec les mêmes sources de rayonnement que celles décrites dans le chapitre 3.2.b relatif à la chromatographie sur colonnes.

Nous utilisons un chromatographe en phase gazeuse Aérograph, modèle 2100, muni de colonnes en Pyrex et de détecteurs à ionisation de flamme.

Les premiers essais, effectués avec les phases apolaires JXR et SE30, confirment les résultats de Ziffer (27) et Kobayashi (26).

Les figures 30 et 31 montrent l'influence, dans la formation des isomères, de chacune des deux sources ultraviolettes utilisées, la figure 30 étant obtenue avec un rayonnement de λ = 2537 Å, la figure 31 avec un rayonnement de $\lambda \geq$ 2700 Å. Ces résultats sont obtenus avec une colonne de 1,80 m. x 2 mm de diamètre intérieur x 6,3 mm de diamètre extérieur, remplie avec 3 % de JXR sur gas chrom Q 100/120.

Les températures de l'injecteur, de la colonne, du détecteur sont respectivement de 265 , 246 et 265°C. Les débits d'hélium, d'hydrogène, et d'air sont respectivement de 30, 30 et 300 ml/min.

Le tableau VII indique les temps de rétention (TR) des différents isomères :

Tableau VII

Isomère	T_R en minutes
Pyrocalciférol + Lumistérol$_2$	14.2
Isopyrocalciférol	15.6
Ergostérol	17.2
Tachystérol$_2$	20.4

Le rapport $\gamma = \frac{\text{Surface du Pic Pyrocalciférol}}{\text{Surface du Pic Isopyrocalciférol}}$,

déterminé avec une solution de prévitamine est de 1,67 et il est constant pour la température de l'injecteur utilisée (265°C). Dans les solutions d'ergostérol faiblement irradiées, où la présence des toxistérols est négligeable, il est possible, suivant l'augmentation de ce rapport, de doser le lumistérol$_2$. En effet, en étalonnant l'appareil avec la prévitamine et le lumistérol$_2$ successivement, et si le rapport constant γ est égal à 1,67 par exemple, il suffira de multiplier, lors de l'analyse d'un milieu irradié, la valeur du pic représentant l'isopyrocalciférol par 1,67 pour avoir la contribution du pyrocalciférol dans le premier pic élué, la différence provenant du lumistérol$_2$.

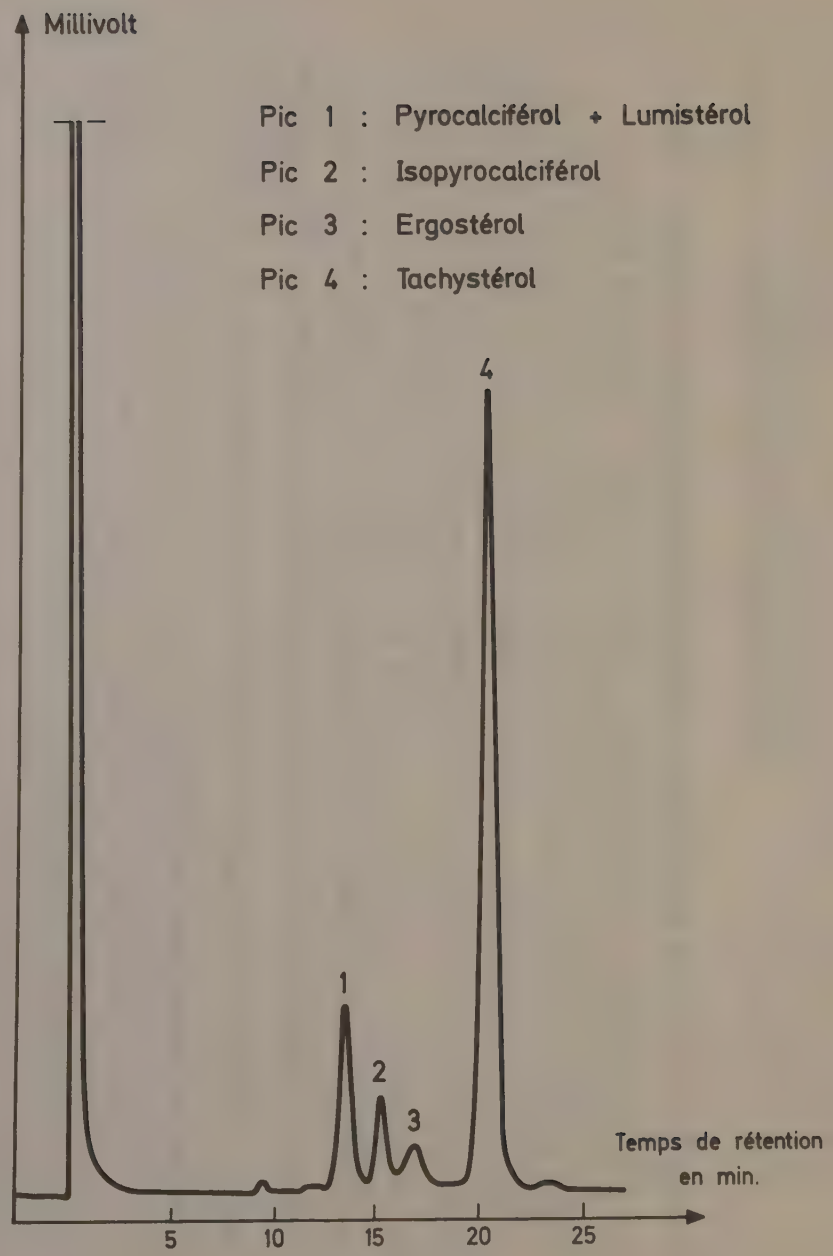

Millivolt
Pic 1 : Pyrocalciférol + Lumistérol
Pic 2 : Isopyrocalciférol
Pic 3 : Ergostérol
Pic 4 : Tachystérol
1
2
3
4
Temps de rétention
en min.
5
10
15
20
25

Fig. 30

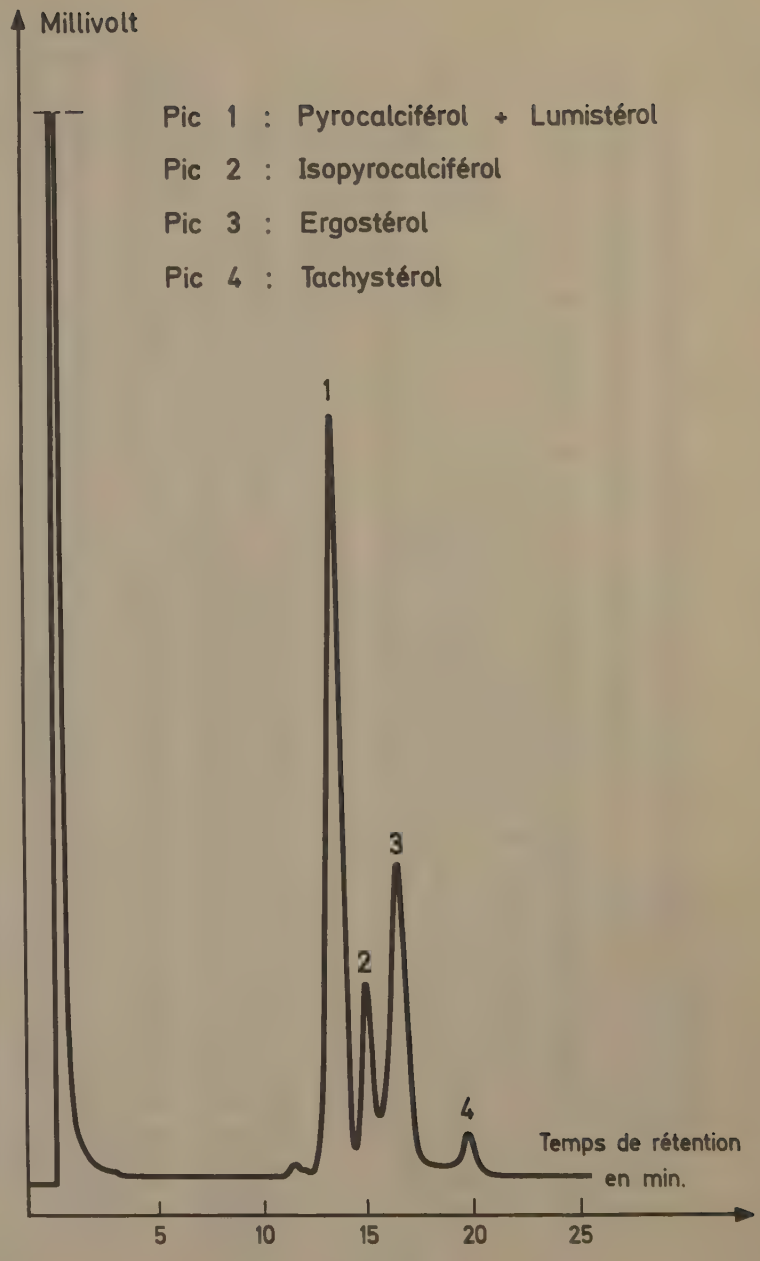

Millivolt
Pic 1 : Pyrocalciférol + Lumistérol
Pic 2 : Isopyrocalciférol
Pic 3 : Ergostérol
Pic 4 : Tachystérol
1
2
3
4
Temps de rétention
en min.
5
10
15
20
25

Fig. 31

Avec des solutions d'ergostérol suffisamment irradiées pour produire des toxistérols, cette méthode n'est plus valable, un des toxistérols formés étant élué avec le pyrocalciférol et le lumistérol$_2$. Ce fait n'est pas signalé dans la littérature. Nous avons ainsi une confirmation supplémentaire que la séparationde la prévitamine et de l'un des toxistérols, avec les trois méthodes chromatographiques utilisées dans notre étude, est très délicate.

De nombreux essais, effectués avec les phases stationnaires suivantes :

OV 17	Phenyl methyl silicone
QF 1	Silicone fluoré
NPGS	Neopentyl glycol succinate
BDS	Butanediol succinate
DC 550	Phenyl methyl silicone
HI - EFF - 8 BP	Cyclohexane dimethanol succinate.

et dans des conditions opératoires différentes (variations du débit de gaz vecteur, de la température de la colonne, de la longueur de la colonne, de la granulométrie du support, du taux de phase stationnaire utilisé) n'ont pas permis d'obtenir des séparations suffisantes entre les isomères de l'ergostérol.

Nous avons également utilisé certaines méthodes de formation de dérivés, en dissolvant un échantillon de 1 ml de solution d'ergostérol irradié, soit dans un mélange pyridine - anhydride acétique pour la formation des acétates (Ac), soit dans un mélange pyridine - anhydride trifluoroacétique pour les trifluoroacétates (TFA), soit dans le mélange pyridine - hexamethyl disilazane - trimethyl chlorosilane pour obtenir des composés trimethylsiliciés (TMSE).

Ces différents dérivés ont apporté une amélioration notable dans la séparation de certains isomères mais, par contre, l'ergostérol et le tachystérol$_2$ ne sont pas séparés (fig.32).

Des résultats satisfaisants (fig.33) ont été obtenus avec les

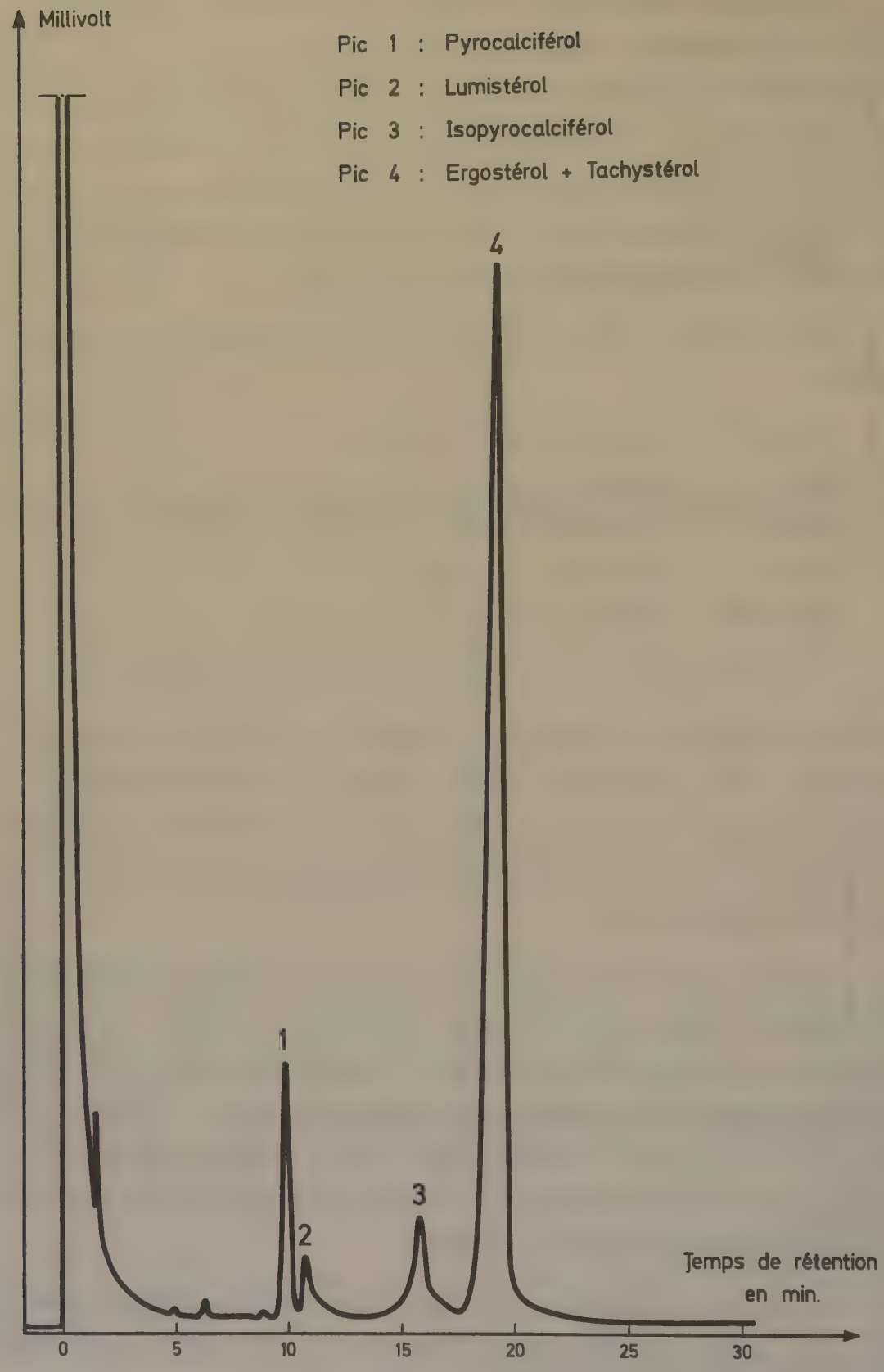

Millivolt
Pic 1 : Pyrocalciférol
Pic 2 : Lumistérol
Pic 3 : Isopyrocalciférol
Pic 4 : Ergostérol + Tachystérol
1
2
3
4
Temps de rétention
en min.
0
5
10
15
20
25
30

Fig. 32

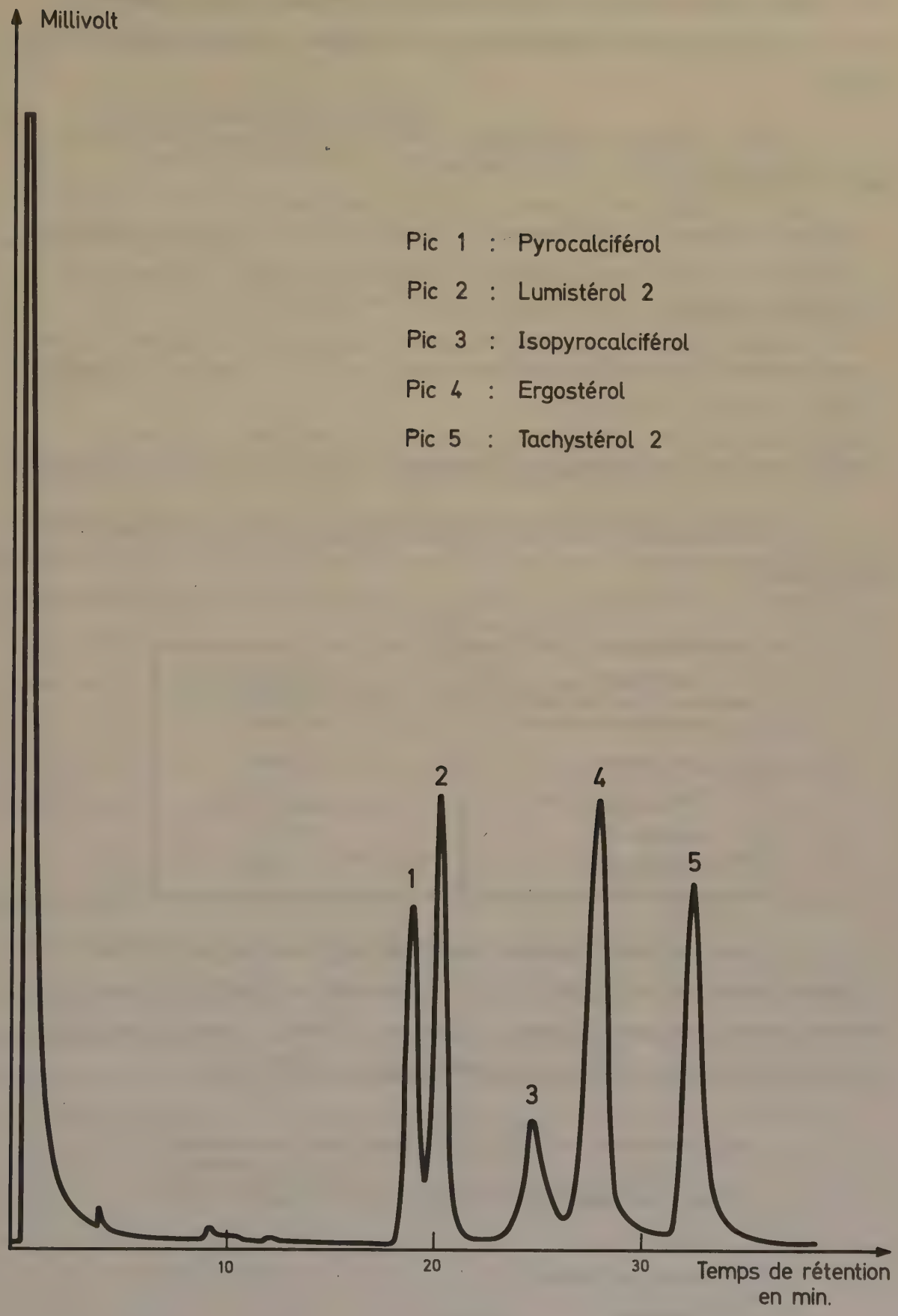

Millivolt
Pic 1 : Pyrocalciférol
Pic 2 : Lumistérol 2
Pic 3 : Isopyrocalciférol
Pic 4 : Ergostérol
Pic 5 : Tachystérol 2
1
2
3
4
5
10
20
30
Temps de rétention
en min.

Fig. 33

deux phases stationnaires XE60 (silicone nitré) et OV 225 (methyl silicone avec 25 % de groupements phényl et 25 % de groupements cyanopropyl).

Pour la phase stationnaire XE60, les conditions opératoires sont les suivantes :

- colonne en pyrex de dimensions 1,80 m x 2 mm de diamètre extérieur x 6,3 mm de diamètre extérieur, remplie de XE60 à 3 % sur gas-chrom Q 100/120.
- températures respectives de l'injecteur, de la colonne et du détecteur : 260°C , 220°C et 260°C.
- débits respectifs d'hélium, d'hydrogène et d'air : 30, 30 et 300 ml/min.

Les temps de rétention (T_R) sont indiqués dans le tableau VIII ci-dessous :

Tableau VIII

Isomère	T_R en minutes
Pyrocalciférol	30.0
Lumistérol$_2$	32.6
Isopyrocalciférol	42.0
Ergostérol	47.9
Tachystérol$_2$	58.2

Les temps de rétention obtenus avec une colonne remplie avec la phase stationnaire OV225, à 1 % sur gas-chrom Q100/120, avec les mêmes conditions opératoires précédentes, mais une température de colonne plus faible, 210°C, sont donnés dans le tableau IX.

Tableau IX

Isomère	T_R en minutes
Pyrocalciférol	30.2
Lumistérol$_2$	33.1
Isopyrocalciférol	42.4
Ergostérol	49.2
Tachystérol$_2$	62.8

Enfin, pour l'analyse quantitative des différents isomères, analyse décrite en 3.3.7, nous avons opéré de la manière suivante :

Préparation de la colonne.

- Colonne en Pyrex de dimensions 3,30 m x 2 mm de diamètre intérieur x 6,3 mm de diamètre extérieur, remplie de XE60 à 3 % sur gas-chrom Q100/120.

Cette colonne est placée dans un four chauffé à une température de 230°C, pendant deux jours , avec un débit de gaz vecteur (Hélium) de 20 ml/min.

Ensuite, la température du four est fixée à 150°C et une dizaine d'injections, de 10 µl d'hexamethyldisilazane chacune, sont effectuées. Lorsque la ligne de base de l'enregistreur est stabilisée, révélant qu'aucune impureté n'est détectée par le détecteur à ionisation de flamme, la température du four contenant la colonne est, de nouveau, réglée à 230°C. Nous attendons que la ligne de base redevienne stable et nous procédons alors à plusieurs dizaines d'injections successives, de 2 µl chacune, d'une solution d'ergostérol irradiée, avant d'utiliser la colonne pour des analyses. Cette procédure réduit les effets d'adsorption sur le support que l'on obtient souvent avec des colonnes neuves.

Certains auteurs, dont Wotiz (40), saturent préalablement les supports avec une quantité relativement importante du composé à étudier.

Notre méthode nous semble préférable puisqu'elle permet également un vieillissement de la colonne ; d'après Brooks (41), les stéroïdes fragiles sont en effet moins décomposés sur des colonnes ayant servi longtemps que sur des colonnes neuves. Nous n'avons pas observé de différences notables dans l'analyse des différents isomères, entre les colonnes en pyrex et les colonnes métalliques en acier inoxydable (fig. 34). Arnold (42) trouve, par contre, que les résultats obtenus avec des colonnes en verre sont meilleurs.

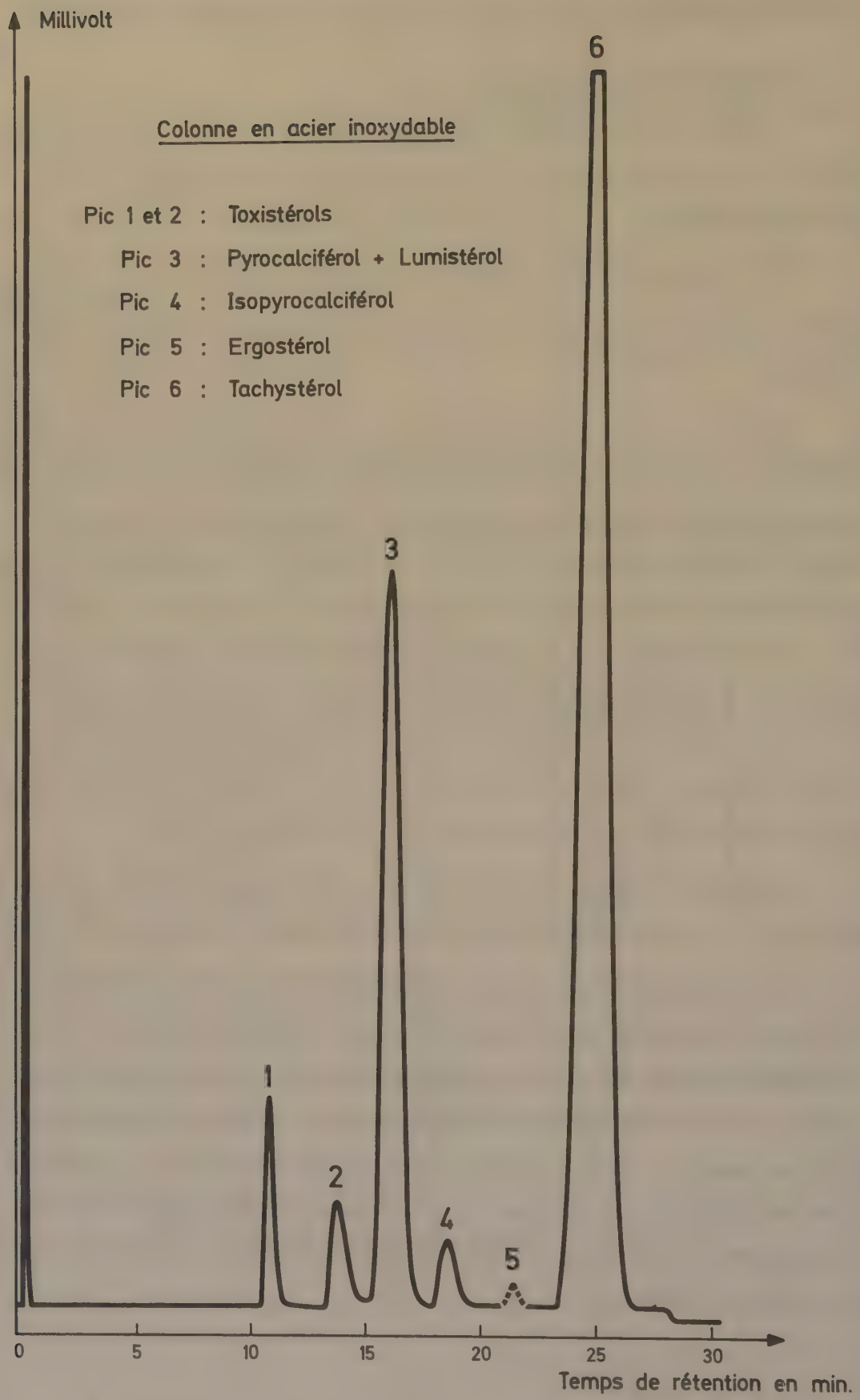

Millivolt
Colonne en acier inoxydable
Pic 1 et 2 : Toxistérols
Pic 3 : Pyrocalciférol + Lumistérol
Pic 4 : Isopyrocalciférol
Pic 5 : Ergostérol
Pic 6 : Tachystérol
1
2
3
4
5
6
0
5
10
15
20
25
30
Temps de rétention en min.

Fig. 34

Conditions opératoires.

Le four de la colonne est chauffé à 230°C, l'injecteur à 260°C et le détecteur à ionisation de flamme à 250°C.

Les pressions d'entrée du gaz vecteur (Hélium), de l'hydrogène et de l'air sont respectivement de 4 kg/cm^2 , 3 kg/cm^2 et 2,7 kg/cm^2.

Les débits, mesurés au niveau du détecteur, sont de 20 ml/min. pour l'hélium et l'hydrogène, et de 300 ml/min. pour l'air.

Les temps de rétention (T_R) obtenus sont donnés dans le tableau X.

Tableau X

Isomère	T_R en minutes
Toxistérol	14.3
Toxistérol	19.0
Toxistérol	21.5
Pyrocalciférol	22.9
Lumistérol$_2$	24.4
Isopyrocalciférol	30.0
Ergostérol	33.7
Tachystérol$_2$	40.8

3.3.3. - Précautions expérimentales - Vérfication de la pureté de chaque isomère - Mesure du rayonnement ultraviolet. -

Nous effectuons l'irradiation et l'analyse des isomères dans le milieu irradié de façon telle que les différents produits ne puissent être altérés par l'oxygène atmosphérique.

Une tubulure latérale, sur l'ampoule d'irradiation, comporte un raccord quartz-pyrex-métal, à 2 voies ; une voie permet de dégazer la solution avant l'irradiation ; l'autre voie, munie d'un raccord type Swagelok 1/4" contenant un septum en silicone, assure l'étanchéité et facilite les prélèvements pour les analyses.

La méthode d'analyse quantitative utilisée(chromatographie en phase gazeuse) est ainsi effectuée sans changer les conditions opératoires pendant les irradiations, par de simples prélèvements, à l'aide d'une microseringue, à travers le septum en silicone.

La chromatographie sur colonne, employée pour l'obtention de chacun des isomères nécessaire à l'étalonnage et à l'analyse qualitative en chromatographie en phase gazeuse et sur couche mince (ainsi qu'à la détermination des différents spectres d'absorption ultraviolette), est effectuée avec le même solvant que celui utilisé dans le milieu irradié ; ceci évite une adsorption résiduelle, surtout sur les parois, lors du passage d'un solvant à un autre.

Les spectres d'absorption ultraviolette de chaque isomère élué par la chromatographie sur colonne, sont obtenus avec un spectrophotomètre type DK-2A-UV lointain. La cuve, placée dans le faisceau de référence ne contient pas de l'oxyde d'éthyle pur, mais de l'oxyde d'éthyle élué par la colonne. Nous avons trouvé, en effet, une différence entre les spectres ultraviolets de l'oxyde d'éthyle élué et de l'oxyde d'éthyle non élué.

Cette procédure est également appliquée dans l'obtention des spectres obtenus par la chromatographie sur couches minces. La cuve placée dans le faisceau référence, contient l'éluat correspondant à un poids de support utilisé (Silicagel ou Oxyde d'Alumine) identique à celui de la bande révélant la présence d'un isomère ; cette dernière bande a son éluat placé dans la cuve échantillon.

La spectrophotométrie ultraviolette est utilisée pour les mesures relatives à la plus petite valeur propre λ_m.

Les quatre isomères sont irradiés séparément dans une cuve de spectrophotomètre munie d'un robinet en verre ; l'étanchéité de ce robinet est assurée par le glycérol, un des rares produits présentant une inertie chimique vis à vis de l'oxyde d'éthyle.

Les deux cuves du spectrophotomètre (échantillon et référence) sont placées à l'intérieur d'un bloc thermostaté, refroidi à 15°C par un courant d'eau froide ; ceci évite une transformation, même faible, de prévitamine en vitamine D_2, pendant les mesures.

Les spectres infrarouges de chaque isomère sont obtenus avec un appareil type Perkin Elmer 225 muni d'un filtre de germanium, absorbant la partie ultraviolette et visible de la source infrarouge ; ce filtre évite, ainsi que nous l'avons observé, une formation de tachystérol à partir de la prévitamine lors des mesures au spectrophotomètre(fig. 35 et 36)

D'autre part, nous nous sommes assurés que la chromatographie en phase gazeuse n'apportait pas de déformations structurales des isomères élués ; les spectres ultraviolets obtenus par piégeage au niveau du détecteur sont identiques à ceux obtenus à basse température. D'ailleurs, Wolinsky (43), dans une étude sur l'isomérisation thermique de l'ergostérol et du déhydrocholestérol trouve que l'ergostérol est stable en-dessous de 350°C.

Vérification de la pureté de chaque isomère.

Chaque isomère, obtenu par la chromatographie sur colonne et sur couches minces, est analysé par la chromatographie en phase gazeuse, après concentration de l'éluat. Si cette analyse qualitative ne révèle aucune impureté, nous procédons à la mesure des spectres d'absorption ultraviolet et infrarouge. Après la mesure effectuée en spectrophotométrie infrarouge, avec une concentration de 0,1 M dans le tetrachlorure de carbone, chaque isomère est de nouveau analysé qualitativement par la chromatographie en phase gazeuse.

Cette méthode nous a permis de constater la formation de tachystérol$_2$ à partir de la prévitamine, c'est-à-dire un passage rapide d'un isomère cis à un isomère trans , pendant les mesures.(fig. 35 et 36)

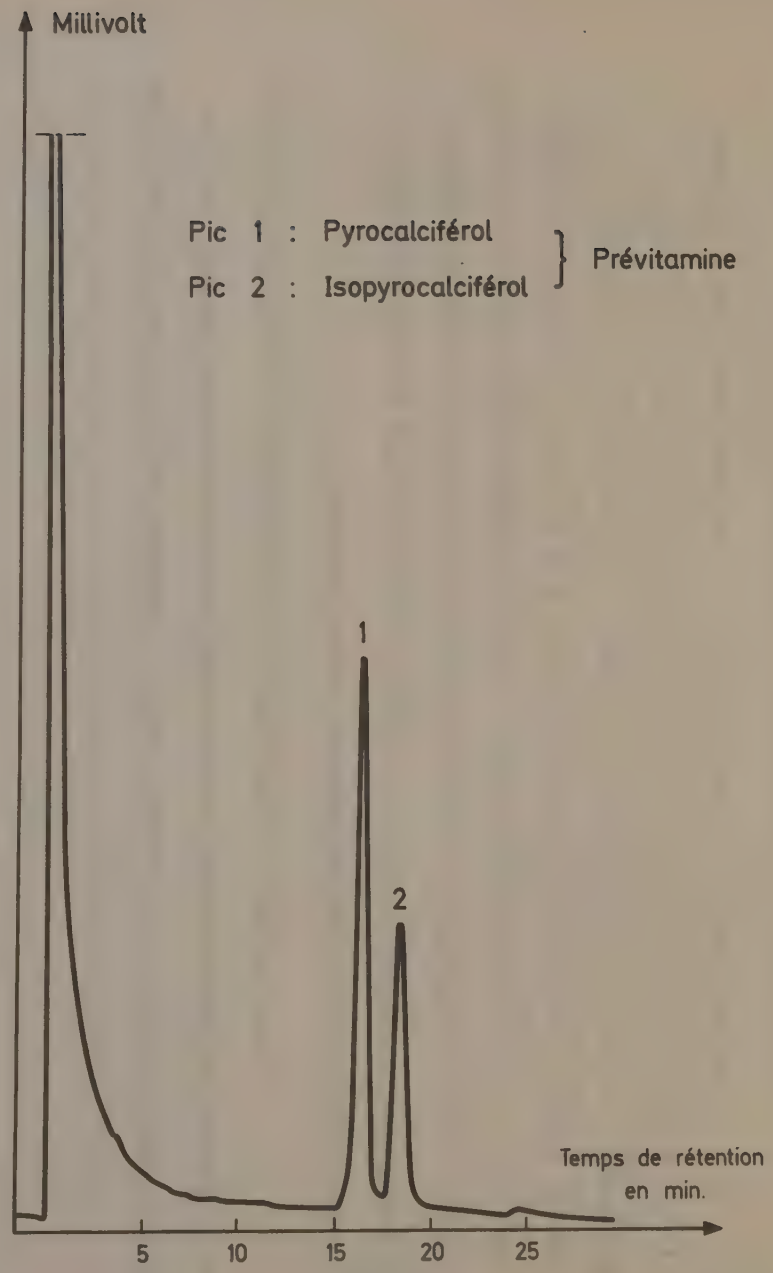

Millivolt
Pic 1 : Pyrocalciférol
Pic 2 : Isopyrocalciférol
Prévitamine
1
2
Temps de rétention
en min.
5
10
15
20
25

Fig. 35

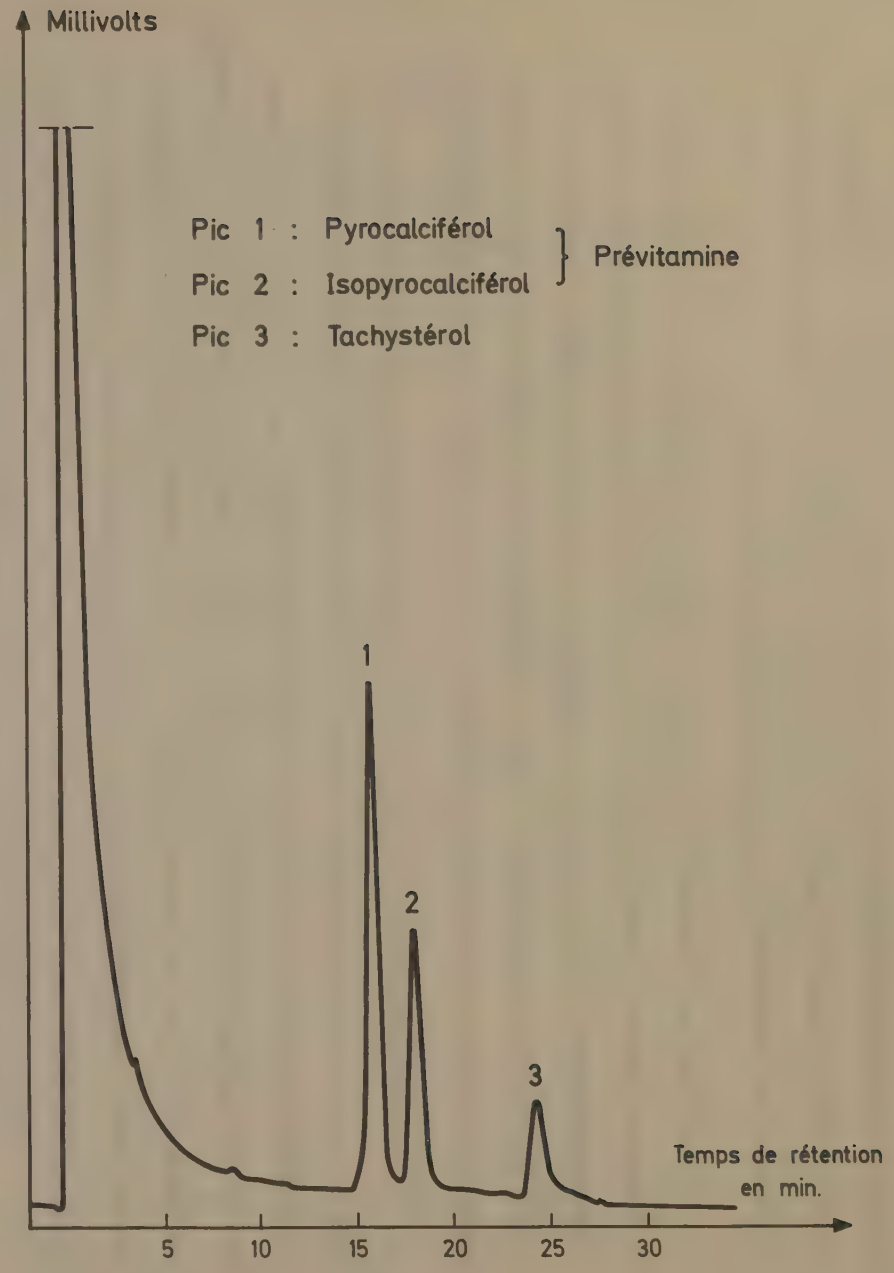

Millivolts
Pic 1 : Pyrocalciférol
Pic 2 : Isopyrocalciférol
Pic 3 : Tachystérol
Prévitamine
1
2
3
Temps de rétention
en min.
5
10
15
20
25
30

Fig. 36

La pureté de chaque isomère est également vérifiée par la spectrophotométrie ultraviolette ; nous déterminons les densités optiques correspondant à plusieurs longueurs d'onde (2600 , 2700 , 2800 et 2900 Å) sur des produits préalablement analysés par la chromatographie en phase gazeuse pour nous assurer de leur pureté ; nous effectuons ensuite les rapports de ces densités optiques et nous les comparons avec les rapports obtenus sur les produits à vérifier.

Cette méthode de vérification supplémentaire permet de déceler rapidement une impureté quelconque ou un mélange de deux isomères par exemple.

Mesure du rayonnement ultraviolet.

Nous avons utilisé le dosimètre Latarjet (61), destiné exclusivement à la mesure du rayonnement ultraviolet de courte longueur d'onde (λ= 2537 Å), émis par les lampes à vapeur de mercure à basse pression, appelées lampes germicides.

Cet appareil est constitué d'une cellule à couche d'arrêt au sélénium, très sensible aux radiations visibles, recouverte d'une substance fluorescente (Willémite ou orthosilicate de zinc, activé par du manganite de baryum)(62), pour sensibiliser la cellule à la longueur d'onde de 2537 Å.

Le rayonnement émis par la lampe germicide rencontre un premier filtre (Corning 9863) qui arrête les radiations visibles et laisse passer les rayonnements ultraviolet et infrarouge ; ceux-ci rencontrent alors la couche fluorescente (qui transforme le rayonnement ultraviolet en lumière verte) puis un second filtre (Katathermic) qui arrête le rayonnement infrarouge.

La cellule à couche d'arrêt n'est donc touchée que par la lumière verte provenant de la radiation ultraviolette, tandis que les radiations visibles et infrarouges sont successivement éliminées.

Cet appareil mesure le débit, c'est à dire la densité de flux énergétique incident, sur le plan de la face d'entrée du dosimètre.

Il est étalonné en unités absolues (ergs/mm^2/sec) ; la courbe d'étalonnage, propre à chaque appareil, donne les valeurs des densités de flux en fonction de la déviation du microampèremètre couplé à la cellule. La densité de flux exprimé correspond à celle reçue effectivement par la face d'entrée du dosimètre ; celle-ci est disposée parallèlement et à la même distance de la lampe germicide que la face d'entrée de l'ampoule d'irradiation.

Connaissant (63) le rapport existant entre les ergs et les électrons-volts, et sachant qu'un photon de 2537 Å transporte une énergie égale à :

$$\frac{12400}{2537} = 4,887 \text{ électrons-volts (soit } 7,8.10^{-12} \text{ erg)}$$

on en déduit le nombre de photons incidents.

Nous avons également utilisé une seconde méthode de mesure du rayonnement ultraviolet, avec des résultats comparables à ceux obtenus par la méthode décrite ci-dessus, l'actinométrie en phase liquide (64 à 70).

Nous avons suivi entièrement la méthode décrite par Hatchard et Parker (70), pour l'utilisation de l'actinomètre en phase liquide le plus employé, l'actinomètre au ferrioxalate de potassium (63) (71) (72) ; son domaine d'utilisation couvre la gamme de longueurs d'onde : 2500 à 4800 Å et il est nettement plus sensible que l'actinomètre à l'oxalate d'uranyle (64) (65).

Nous avons irradié les solutions de ferrioxalate de potassium dans les mêmes conditions expérimentales que les solutions d'ergostérol (l'ampoule d'irradiation, la température, la géométrie par rapport à la source sont identiques).

L'intensité du rayonnement incident arrivant sur la face intérieure de l'actinomètre est donnée par la formule suivante :

$$I_o \text{ (quanta/sec.)} = \frac{n\,Fe^{2+}}{\Phi_{Fe^{2+}} \cdot t\,(1 - 10^{-\varepsilon C \ell})}$$

$n_{Fe^{2+}}$ est le nombre de molécules de Fe^{2+} formées pendant le temps d'irradiation t ; il est déterminé par les mesures expérimentales de deux facteurs :

1) coefficient d'extinction ε (une courbe d'étalonnage établie préalablement donne les valeurs de ε en fonction du pourcentage de Fe^{2+} présent dans des solutions étalons.

2) densité optique δ (on effectue cette mesure, après irradiation, à la longueur d'onde de 5100 Å, sur des solutions actinométriques irradiées auxquelles on ajoute une solution constituée d'un mélange de phénanthroline, d'acétate de sodium et d'acide sulfurique dans l'eau distillée.

$\phi_{Fe^{2+}}$ est le rendement quantique de formation de Fe^{2+} dans l'actinomètre ; nous avons utilisé la valeur déterminée par Hatchard et Parker (70) ($\phi Fe^{2+} = 1,25$).

$(1 - 10^{-\varepsilon c \ell})$ représente la fraction du rayonnement incident absorbée par la solution actinométrique ; elle est calculée à partir de la détermination de la concentration c, du coefficient d'extinction ε et du parcours optique de la cuve d'irradiation ℓ.

3.3.4. - Purification de l'ergostérol. -

L'ergostérol, découvert et isolé par Tanret (44), est souvent accompagné d'un mélange de stérols dont les principaux sont le 5-dihydroergostérol et le zymostérol (56) (57) ; il est donc nécessaire de purifier l'ergostérol avant d'étudier son comportement photochimique et ses différentes transformations isomériques.

Parmi les nombreux travaux effectués dans ce domaine (45 à 55), nous avons retenu les méthodes de purification décrites par Callow et utilisées par Shaw (50) et Rappoldt (11).

Callow (49) confirme que le zymostérol peut être éliminé par des recristallisations directes de l'ergostérol dans un mélange alcool-benzène (1 : 2) ; par contre, le 5-dihydroergostérol nécessite une

méthode plus complexe de recristallisations fractionnées à partir d'un ester adéquat, le benzoate d'ergostérol.

Nous avons étudié ces méthodes générales de purification de l'ergostérol ; le degré de pureté a été contrôlé par les mesures du point de fusion et du coefficient d'extinction moléculaire.

La détermination des points de fusion des différents lots d'ergostérol de diverses provenances est effectuée à l'aide de l'appareil Heraeus type Fus-O-Mat ; le tracé de l'analyse thermique nécessite quelques milligrammes de produit, placés dans un tube capillaire ; la détermination du point de fusion est précise à $\pm$ 0,1°C.

Nous avons constaté, lors des premiers essais, que la meilleure qualité d'ergostérol était fournie par la Société SIGMA (point de fusion du produit commercial : 160°C) ; nous l'avons utilisé pour étudier deux méthodes de purification directe (49), (54).

1ère méthode.

Nous avons effectué deux séries de recristallisations successives dans l'alcool éthylique à 95 % , en présence de charbon actif. Les résultats sont donnés dans le tableau XI.

Tableau XI

	Point de fusion en °C	Remarques
1ère recristallisation	161	En présence de charbon animal en poudre.
2ème recristallisation	162,3	En présence de charbon végétal activé.

2ème méthode.

Quatre séries de recristallisations successives sont réalisées dans le mélange alcool éthylique - Benzène (1 : 2).

Le Tableau XII donne les variations observées du point de fusion.

Tableau XII

	Point de fusion en °C
1ère recristallisation	161,5
2ème recristallisation	162,2
3ème recristallisation	163,3
4ème recristallisation	163,5

L'ergostérol, recristallisé quatre fois, possède un coefficient d'extinction moléculaire ε égal à 11910, identique à celui donné par Shaw (50) ; ce résultat est toutefois un peu plus faible que celui obtenu avec de l'ergostérol purifié par l'intermédiaire d'un ester, suivant la méthode décrite par Callow (49). Nous décrivons ci-dessous le principe de cette méthode, que nous avons appliqué, et les résultats expérimentaux que nous avons obtenus.

3ème méthode.

L'ergostérol est estérifié puis recristallisé plusieurs fois ; une saponification permet finalement de récupérer l'ergostérol purifié. L'estérification est effectuée par le traitement, à la température ambiante, de l'ergostérol (1 partie) avec le chlorure de benzoyle fraîchement redistillé (3 volumes), en milieu pyridinique anhydre (20 volumes).

Le benzoate d'ergostérol obtenu est lavé puis recristallisé quatre fois dans l'acétate d'éthyle sec ; son point de fusion, mesuré après chacune des recristallisations, est successivement de 163,5°C , 165°C , 165,5°C et 166°C.

Le benzoate d'ergostérol est ensuite chauffé avec 25 parties d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium, sous azote ; nous

récupérons ensuite l'ergostérol purifié et nous le recristallisons deux fois dans l'alcool éthylique à 95 % ; son point de fusion est de 165,1°C ; son coefficient d'extinction moléculaire ε est égal à 11950, valeur inférieure de 1,6 % à la valeur obtenue par Shaw (50).

Nous avons enfin essayé la méthode de précipitation de l'ergostérol par la digitonine, mise au point par Windaus (16), pour déceler une éventuelle amélioration dans la purification de l'ergostérol, vis-à-vis des stérols contenus dans les produits commerciaux.

La formation de complexes très peu solubles dans l'éthanol est particulièrement spécifique des 3β - hydroxystéroïdes alors que les 3α -hydroxystéroïdes et les stéroïdes ne portant pas un groupe hydroxyle en C_3 ne sont pas précipités par la digitonine.

Le complexe formé de la digitonine (poids moléculaire : 1229,34) et de l'ergostérol (poids moléculaire : 396,66) résulte d'une combinaison équimolaire ; le coefficient de proportionnalité théorique est égal à :

$$\frac{396,66 + 1229,34}{396,66} = 4,10$$

Nous avons obtenu un coefficient de proportionnalité égal à 3,95.

Le complexe est détruit par un chauffage prolongé, avec mise au reflux en milieu pyridinique, sous azote ; la pyridine est enlevée par une distillation sous vide. Nous traitons ensuite le résidu suivant la méthode décrite par Bergman (58), dans un appareil type Soxhlet ; l'extrait est filtré, puis séché jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Cette dernière méthode ne nous a pas apporté une amélioration notable dans la purification de l'ergostérol. Il est vrai que, d'après Haslam (59) et Klyne (60), la configuration en C-5 et la nature, tant de la chaine latérale que des substituants du cycle D, influencent considérablement la précipitabilité des 3β - hydroxystéroïdes avec la digitonine.

Il nous apparaît donc que le 5-déhydroergostérol précipite de la même façon, avec la digitonine, que l'ergostérol.

D'après nos résultats expérimentaux, la meilleure méthode de purification de l'ergostérol est la méthode préconisée par Callow (49).

3.3.5.- Spectrophotométrie ultraviolette.-

Les spectres ultraviolets des isomères photochimiques de l'ergostérol ont été précédemment déterminés, entre autres, par Havinga (9), Shaw (29), Westerhof (34) et Velluz (89) ; nous avons obtenu des spectres identiques avec des corps obtenus par la chromatographie sur couche mince (fig. 18) et par la chromatographie sur colonne (fig. 27).

La chromatographie en phase gazeuse permet également, avec un dispositif que nous avons mis au point, de recueillir une quantité suffisante de chacun des isomères pour l'analyse au spectrophotomètre ; directement à la sortie de la colonne, et à l'intérieur du four, nous plaçons un raccord type Swagelok à 3 voies ; une voie, constituée d'un tube de diamètre intérieur égal à 1,18 mm, permet d'amener une partie de l'effluent sur le détecteur à ionisation de flamme; l'autre voie dirige la plus grande partie de l'effluent, par un tube de diamètre intérieur 3,2 mm, sur un capillaire extérieur de 6 centimètres de longueur et de 1,5 mm de diamètre intérieur. De nombreux essais nous ont permis de constater que les stéroïdes que nous avons étudiés (poids moléculaire : 396,66) ont une tendance très nette à se condenser sur les parois internes, malgré les températures utilisées (250 à 300°C) ; le parcours entre la sortie de la colonne et le capillaire doit donc être le plus court possible (3 centimètres);il n'est pas, en outre, nécessaire de refroidir le capillaire, ni de lui donner les formes utilisées couramment pour les pièges ; après l'élution d'un isomère, le capillaire est rincé intérieurement avec de l'alcool éthylique pour entrainer l'éluat dans la cuve échantillon du spectrophotomètre.

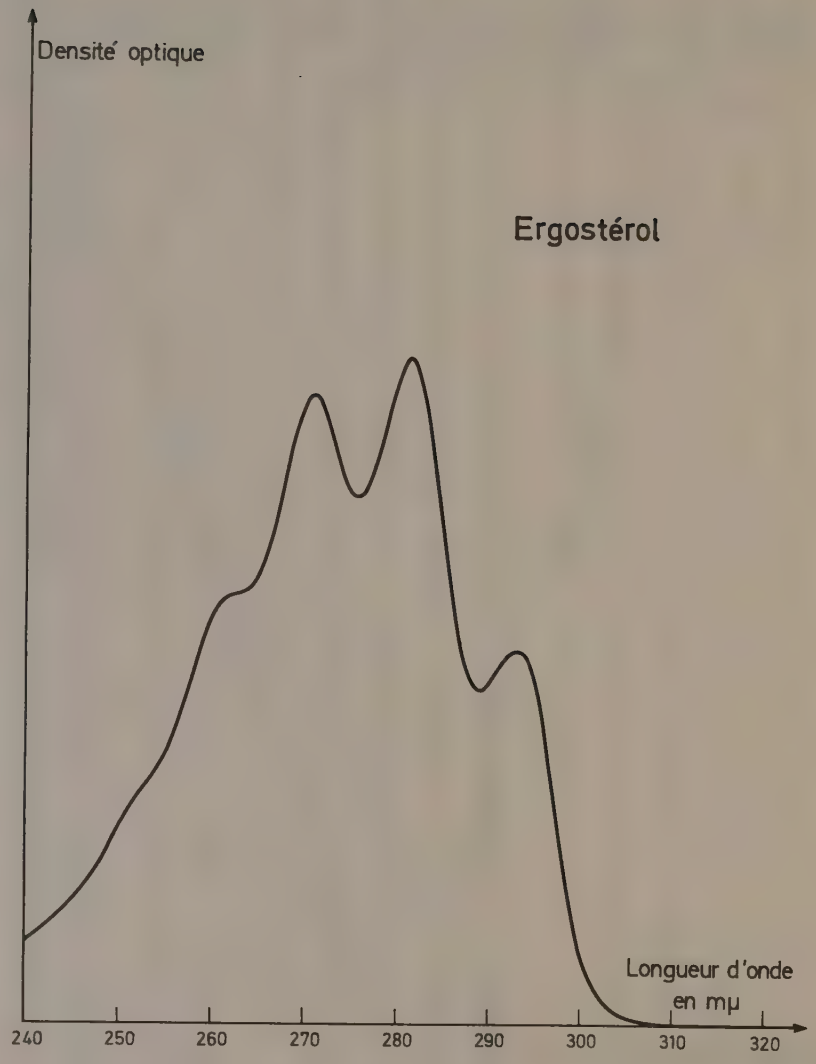
Les isomères sont injectés séparément, sauf le tachystérol$_2$, sur une colonne en Pyrex de dimensions 6,3 mm x 1,50 m , remplie avec la phase stationnaire OV17 à 3 % sur le support gas Chrom Q 100/120.

Le tachystérol$_2$ est piégé directement à partir d'une solution d'ergostérol irradié douze heures avec une source ultraviolette de longueur d'onde 2537 Å ; la quantité injectée est de 50 µl.

Nous n'avons pas décelé de déformation sur les différents spectres (fig.$\frac{37}{38}$) obtenus par l'intermédiaire de la chromatographie en phase gazeuse ; ils sont identiques aux spectres fournis par les deux autres méthodes chromatographiques utilisées ; ce fait nous permet de constater que la structure des isomères analysés n'est pas perturbée par cette méthode d'analyse, malgré la température élevée (280°C), et que les pics chromatographiques sont bien représentatifs des isomères injectés ; on remarque sur la figure 38 , la présence supplémentaire des deux isomères thermiques de la prévitamine et de la vitamine D$_2$, le pyrocalciférol$_2$ et l'isopyrocalciférol$_2$; leurs spectres ultraviolets sont identiques à ceux donnés dans la littérature (29).

Les spectres ultraviolets de la vitamine D$_2$ et de ses différents isomères photochimiques sont donnés en annexe 2; les produits sont fournis par la chromatographie sur colonne,uniquement.

L'analyse spectrophotométrique a été faite avec un spectrophotomètre Beckman type DK-2A-UV lointain ; cet appareil permet d'effectuer des mesures entre les longueurs d'onde 160 et 3500 mµ; nous avons utilisé une lampe à hydrogène comme source ultraviolette et un photomultiplicateur comme détecteur.


Densité optique
Ergostérol
Longueur d'onde
en mμ
240
250
260
270
280
290
300
310
320

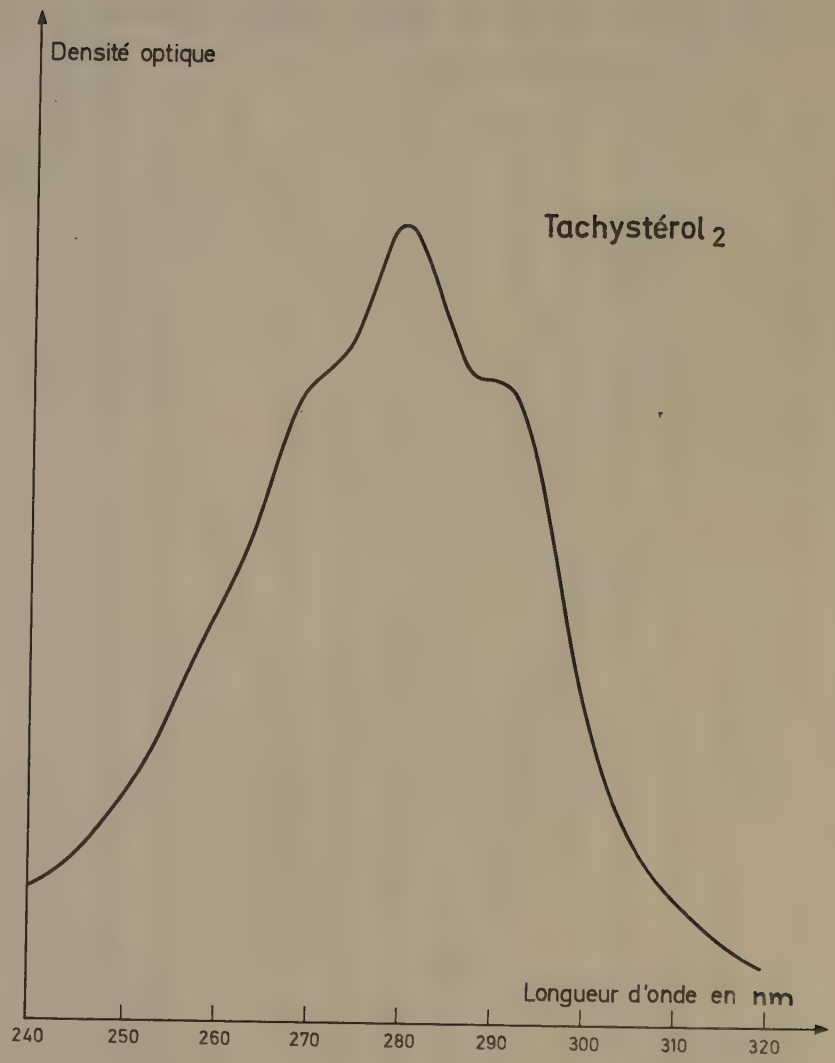

Densité optique
Tachystérol 2
Longueur d'onde en nm
240
250
260
270
280
290
300
310
320

Fig. 37

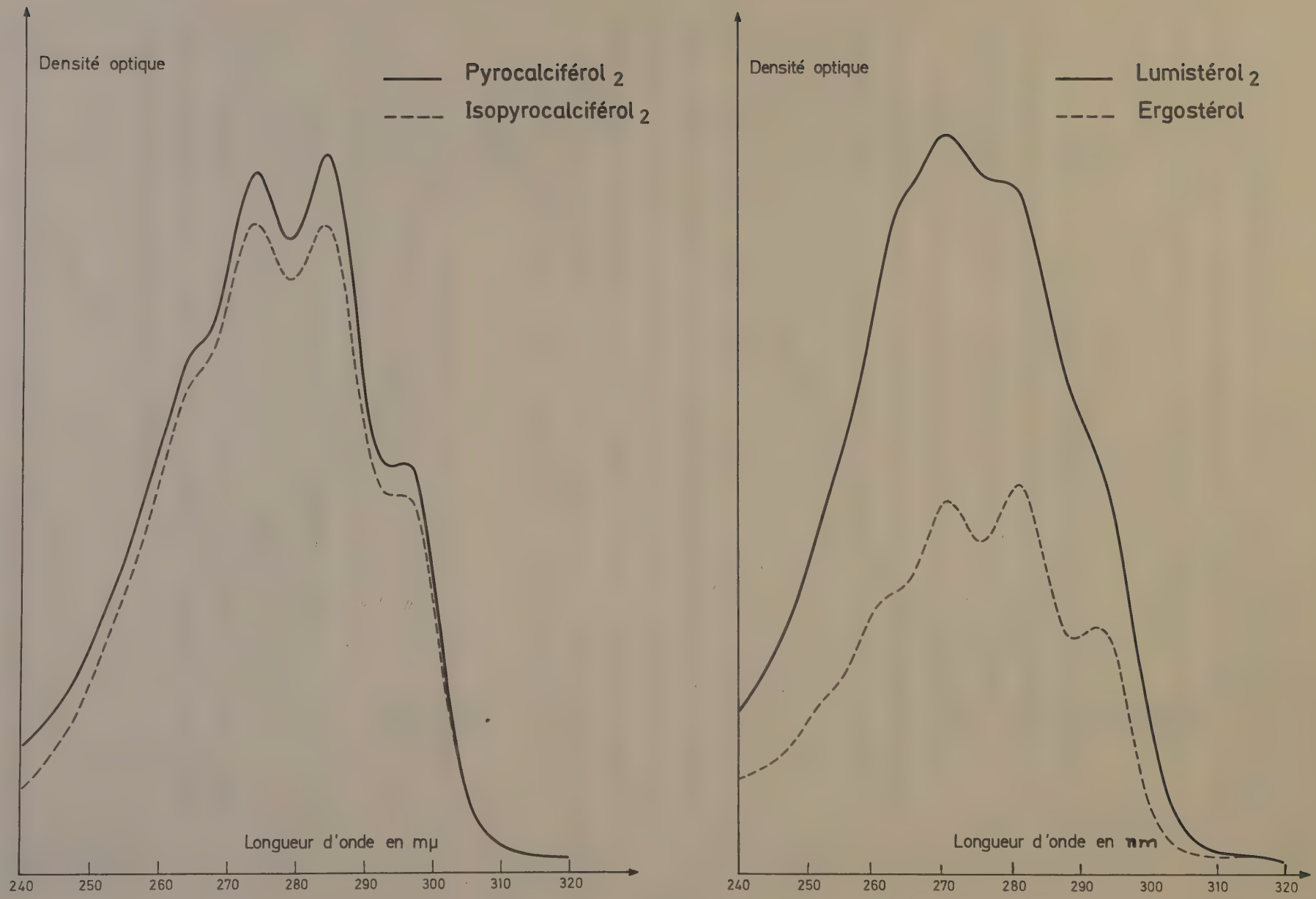

Densité optique
Pyrocalciférol 2
Isopyrocalciférol 2
Longueur d'onde en mμ
240
250
260
270
280
290
300
310
320
Densité optique
Lumistérol 2
Ergostérol
Longueur d'onde en nm
240
250
260
270
280
290
300
310
320

Fig. 38

3.3.6.- Spectrophotométrie Infrarouge.-

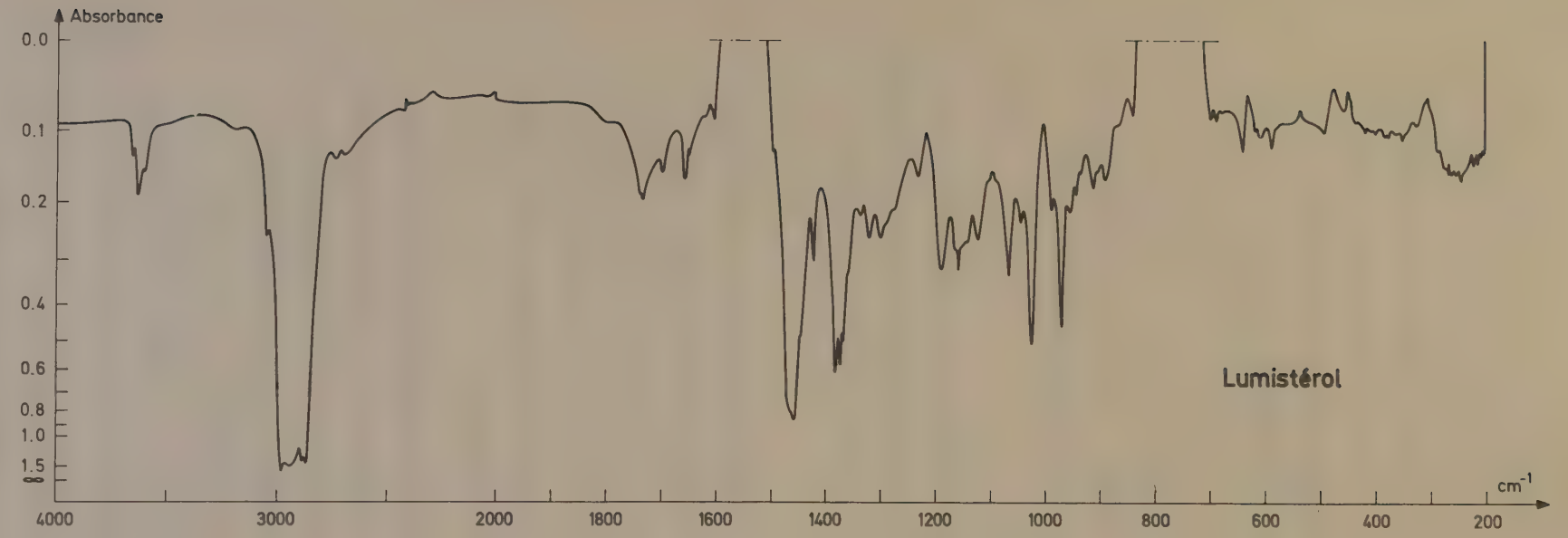
Les spectres infrarouges de la prévitamine et de la vitamine D_2 ont été déterminés par Velluz (90) ; l'observation des deux spectres montre des absorptions différentes dans la région spectrale qui intéresse le groupe méthylène (= CH_2), vers 900 cm^{-1} ; la prévitamine, contrairement à la vitamine D_2, ne possède pas l'absorption caractéristique de ce groupe. Les spectres du tachystérol$_2$, de la prévitamine et de la vitamine D_2 ont, également, été obtenus par Koevoet (5), dans la région 1300-700 cm^{-1}, et ils sont semblables à ceux donnés par Inhoffen (6) et Velluz (90) ; la présence d'une bande importante dans le spectre du tachystérol$_2$, à 957 cm^{-1}, a permis d'assigner à ce corps, la structure Δ6, 7 - trans.

Les spectres infrarouges de tous les isomères photochimiques de l'ergostérol et de la vitamine D_2 ont été donnés par Koëvoet (91) ; ils sont déterminés, dans la région 1300 - 700 cm^{-1}, avec le sulfure de carbone comme solvant.

Cette méthode d'analyse a permis à Pirlot (92) de doser la vitamine D_2 dans les produits d'irradiation de l'ergostérol ; Morris (93) dose, par différence, les vitamines D_2 et D_3 ; la vitamine D_2 présente une bande d'absorption à 970 cm^{-1}, due à la vibration du groupe -C-H dans la chaine latérale, non saturée ; la vitamine D_3 possède une chaine saturée et ne présente pas cette bande d'absorption.

Les différents isomères que nous avons analysés en spectrophotométrie infrarouge sont obtenus, sauf la vitamine D_2, par la chromatographie sur colonne d'une solution d'ergostérol irradié ; le solvant d'élution, l'oxyde d'éthyle, est évaporé sous azote et sous vide primaire, puis il est remplacé par le tétrachlorure de carbone ; l'ergostérol, formant un gel avec ce solvant, est dissous dans le sulfure de carbone. Les concentrations utilisées sont voisines de 0,1 M. (fig. 39, 40, 41).

Tous les isomères sont analysés préalablement par la chromatographie en phase gazeuse pour déceler les impuretés éventuelles, puis de nouveau,après leur passage au spectrophotomètre.


Absorbance
0.0
0.1
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.5
∞
Lumistérol
cm⁻¹
4000
3000
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200

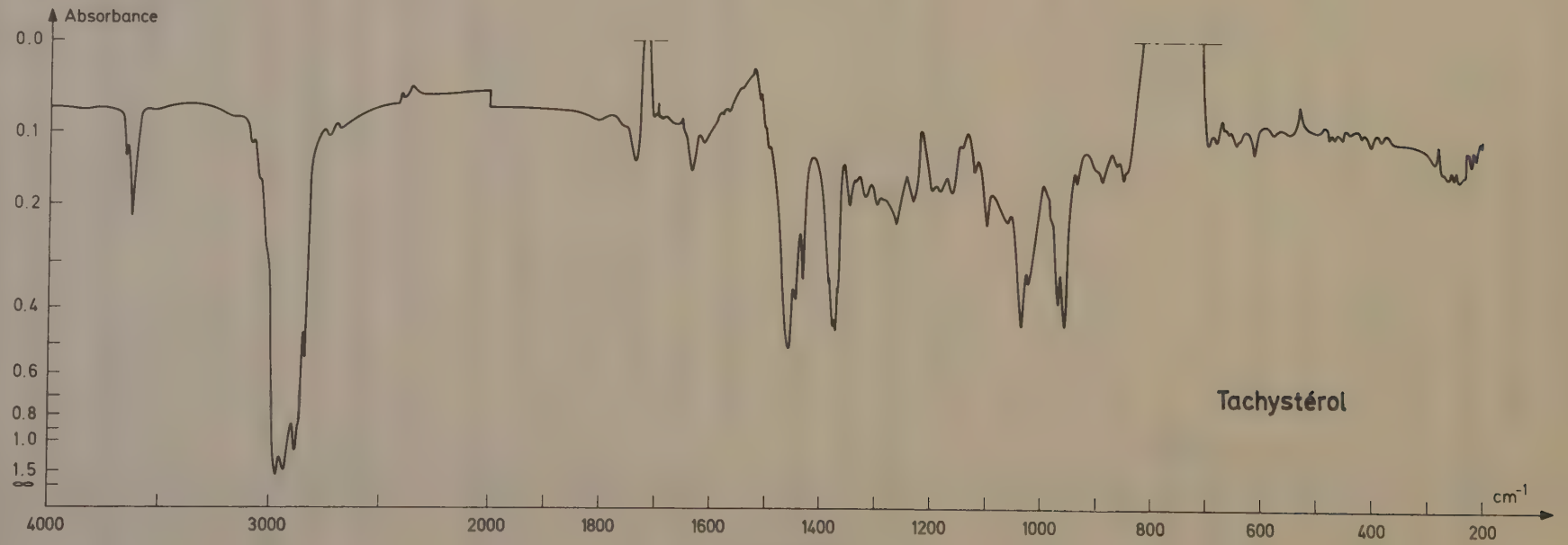
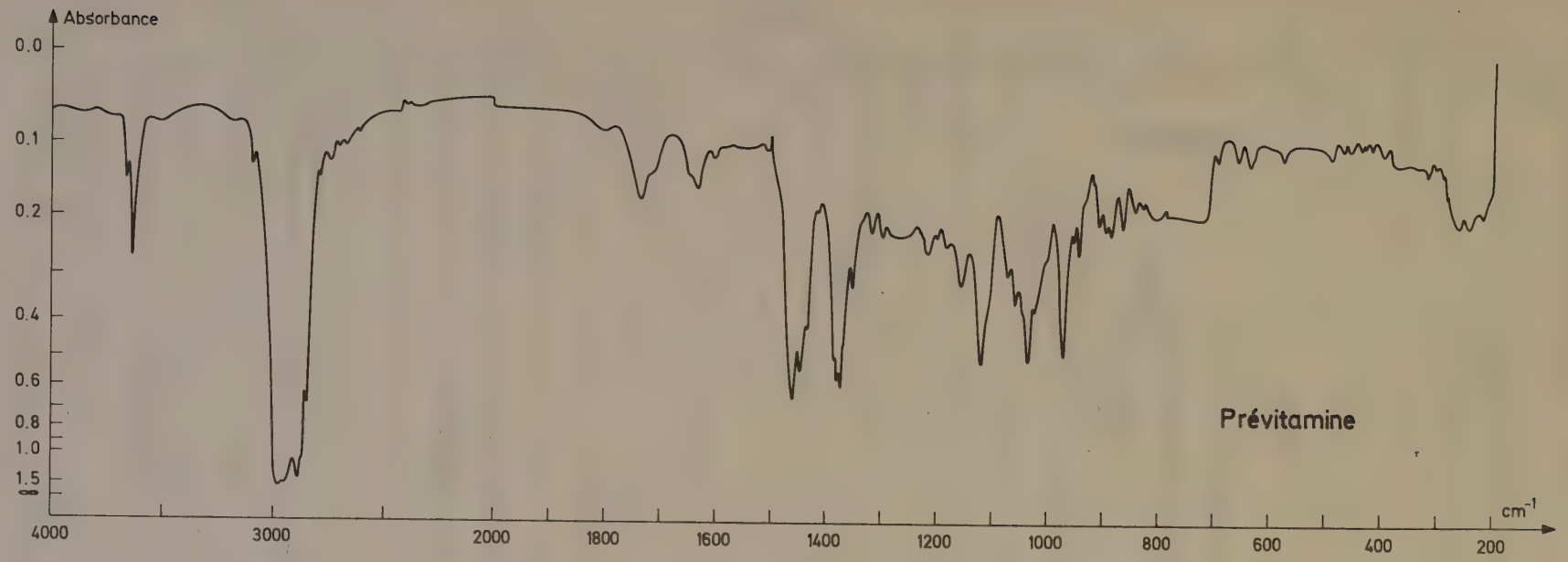

Absorbance
0.0
0.1
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.5
∞
Tachystérol
cm⁻¹
4000
3000
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200

Fig. 39


Absorbance
0.0
0.1
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.5
Prévitamine
4000
3000
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
cm⁻¹

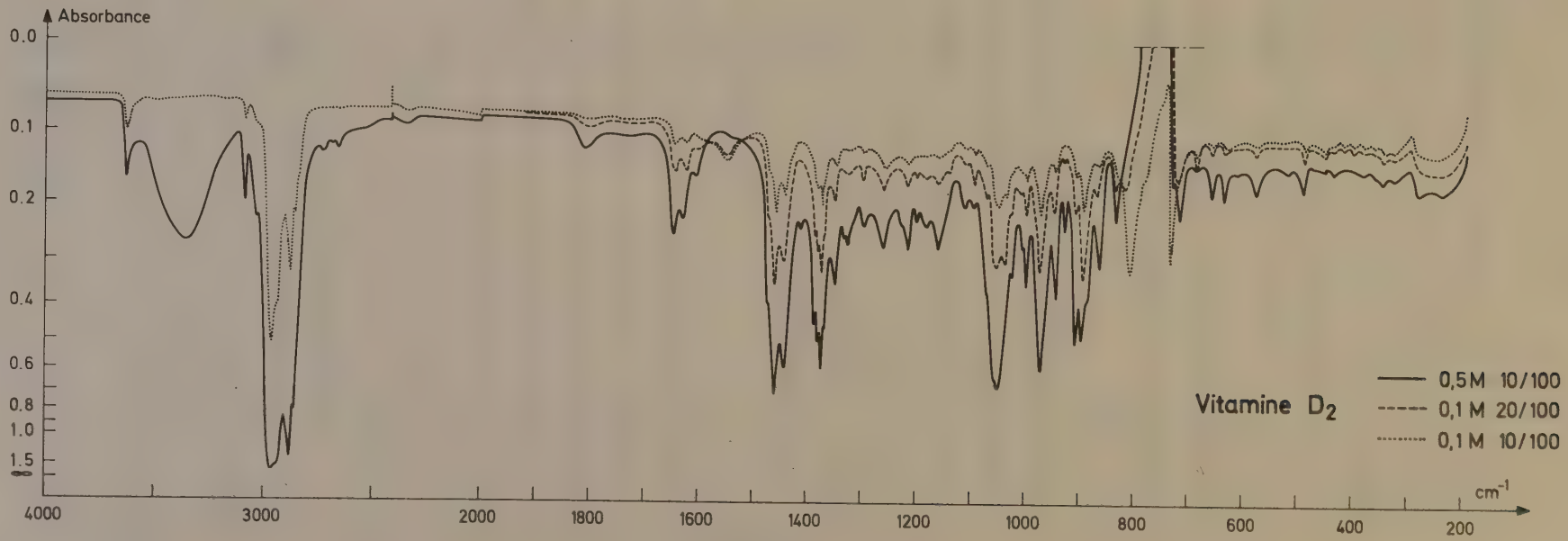
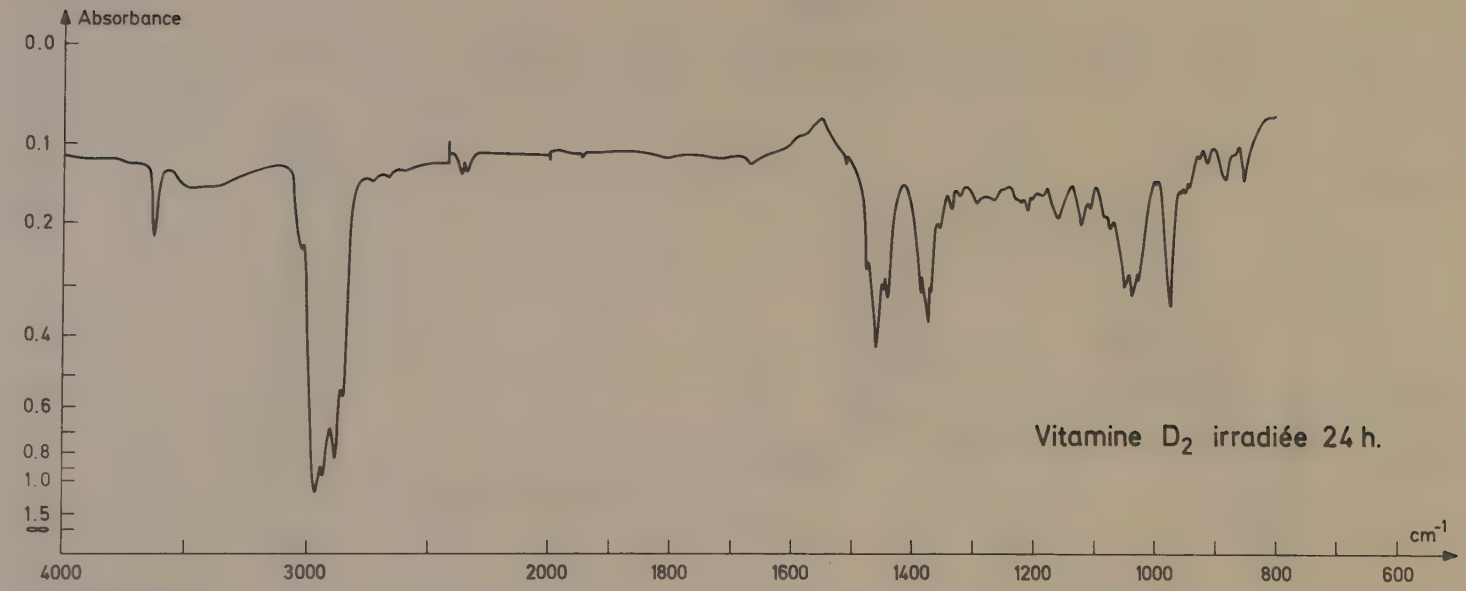

Absorbance
0.0
0.1
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.5
Vitamine D2
0,5 M 10/100
0,1 M 20/100
0,1 M 10/100
4000
3000
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
cm⁻¹

Fig.40


Absorbance
0.0
0.1
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.5
∞
Vitamine D_2 irradiée 24 h.
cm^{-1}
4000
3000
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600

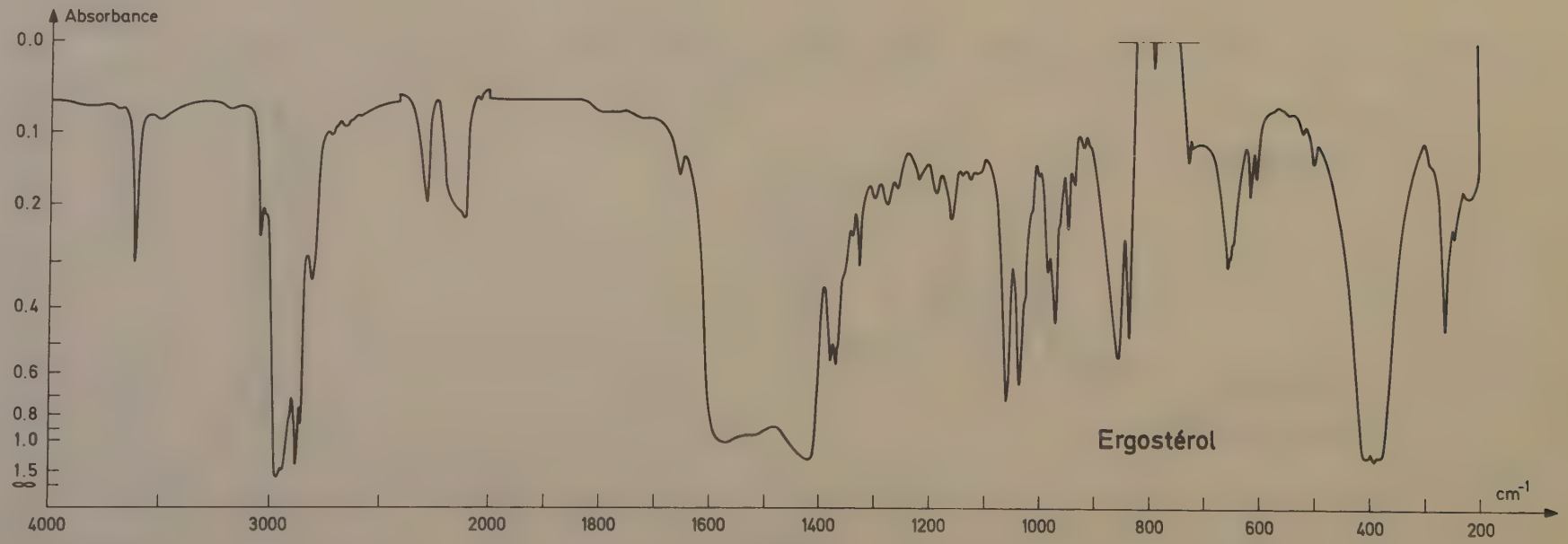

Absorbance
0.0
0.1
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.5
∞
Ergostérol
cm^{-1}
4000
3000
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200

Fig. 41

Les différentes précautions prises pour l'obtention des spectres ont été décrites (parag. 3.3.3.).

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre infrarouge à réseau, Perkin Elmer modèle 225, à double faisceau. Le domaine d'analyse est compris entre 4000 et 200 cm^{-1}. Les spectres infrarouges sont identiques aux spectres donnés dans la littérature et ils ont été réalisés grâce à l'obligeance de MM. Ceccaldi et Leicknam et de Melle Henry.

3.3.7.- Méthode d'analyse quantitative utilisée pour la détermination des compositions relatives en régime permanent d'évolution.-

Les méthodes de séparation que nous avons employées pour l'analyse qualitative (parag. 3.3.2) ont montré que pour des durées d'irradiation importantes, nécessaires à l'obtention du régime permanent d'évolution, la prévitamine et un des toxistérols n'étaient pas séparés ; seule, la chromatographie en phase gazeuse, effectuée avec des colonnes longues et un taux de phase stationnaire polaire de 3 %, nous a permis d'obtenir une séparation suffisante entre ces deux isomères.

De nombreuses critiques ont été faites sur l'utilisation de cette méthode dans l'analyse des stéroïdes, hormones, vitamines, et autres substances très fragiles ; néanmoins, devant son emploi très fréquent et les nombreux travaux (37 à 40 , 73 à 88) effectués dans ce domaine, il apparait établi que la chromatographie en phase gazeuse est une méthode d'analyse valable ; il est nécessaire, toutefois, de tenir compte des remarques faites par différents chercheurs, à la suite de leurs travaux. Horning (94), Scholler et Dehenin (73) ont mis l'accent sur quelques problèmes de base posés par l'analyse quantitative des stéroïdes. Wotiz (40), Fales (40), Karmen (40), Vandenheuvel (40) (73), Marmion (74), Whittier (77), Kabot (78) et Lau (95), se sont attachés à décrire les différents aspects de l'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des stéroïdes.

Nous avons pris des précautions supplémentaires à celles décrites pour l'analyse qualitative (parag. 3.3.2.c).

- Aucune présence dæ phase stationnaire et de support dans la partie de la colonne qui est en contact avec la partie chaude de l'injecteur.
- Volume constant injecté à chaque mesure : 2,6 µl, déterminé par différence des volumes contenus dans la microseringue et l'aiguille, avant et après l'injection.
- Température constante du four de la colonne : 230°C. Nous évitons ainsi une variation de la température se produisant parfois lorsque la programmation est utilisée ; le degré de séparation des isomères est, en effet, très sensible aux faibles variations de température.
- Emploi de la même colonne pour toutes les mesures (la température du four est ramenée à 150°C la nuit pour éviter une trop grande désorption de la phase stationnaire).

Les deux méthodes les plus courantes, pour l'analyse quantitative des chromatogrammes, sont la normalisation interne et l'étalonnage interne. Cette dernière méthode, la plus répandue, nécessite quelques remarques pour son application (73). L'étalon interne doit avoir une structure voisine de celle du ou des composés à doser ; son pic d'élution doit apparaître entre les pics du premier et du dernier corps élué et sa concentration doit être peu différente de celle des corps à doser. Compte tenu de ces remarques, nous n'avons pas pu utiliser cette méthode car l'analyse qualitative a montré la présence de huit isomères dans les solutions d'ergostérol irradié ; il nous a été impossible d'inclure une substance supplémentaire qui puisse être nettement séparée des autres constituants du mélange.

Nous avons donc employé la méthode de normalisation interne, très utilisée dans l'analyse quantitative des gaz, qui permet de connaître la proportion d'un constituant dans un mélange (ou les rapports entre plusieurs constituants) ; cette méthode implique surtout que le chromatogramme obtenu représente bien la totalité des constituants du mélange, c'est à dire que chacun ait un pic distinct (39). (fig. 42).

La mesure de la surface des pics représentant les quatre isomères du graphe vrai (E , P , T , L) est effectuée par un intégrateur digital électronique (Varian Aerograph modèle 480).

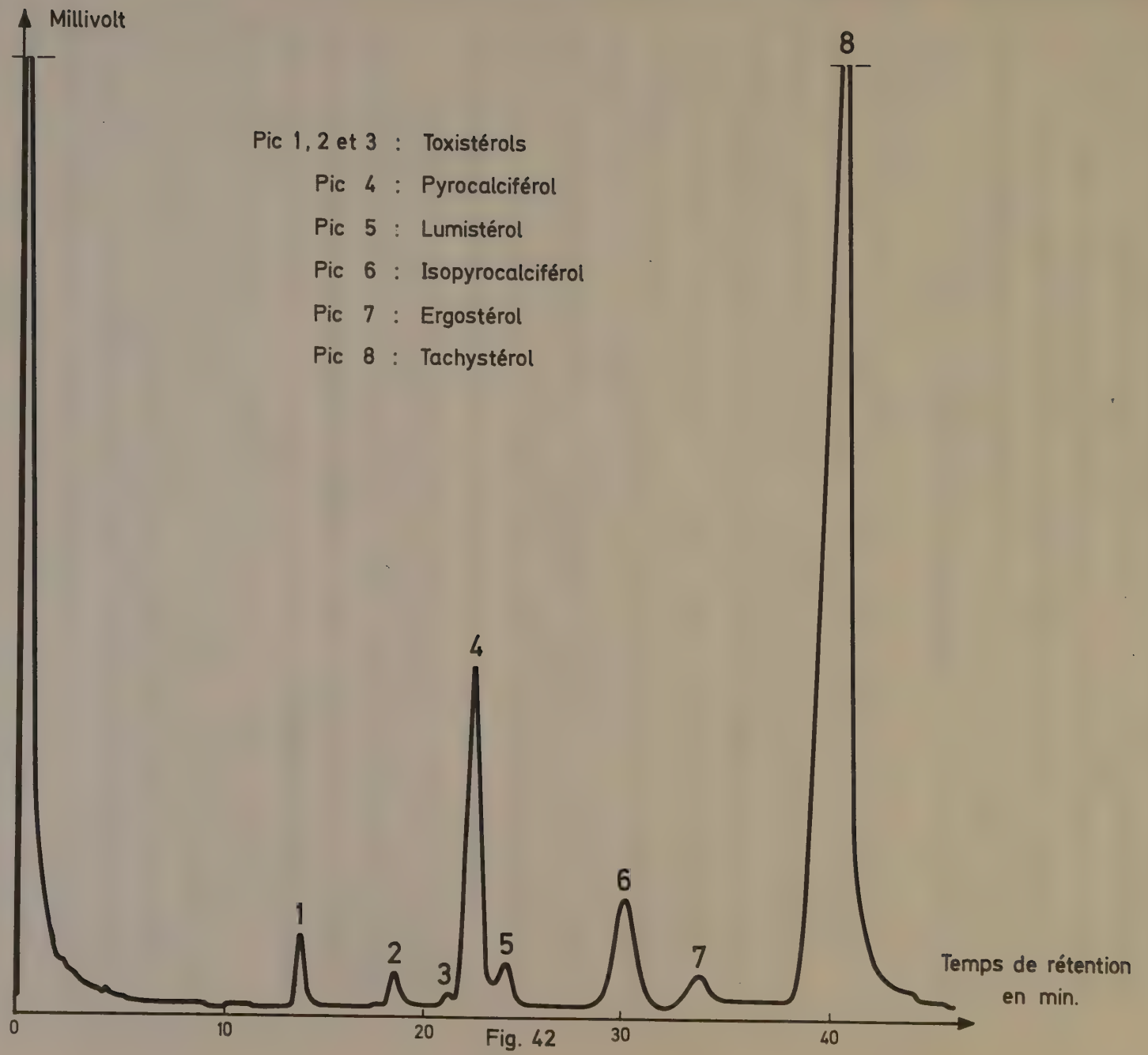

Millivolt
Pic 1, 2 et 3 : Toxistérols
Pic 4 : Pyrocalciférol
Pic 5 : Lumistérol
Pic 6 : Isopyrocalciférol
Pic 7 : Ergostérol
Pic 8 : Tachystérol
1
2
3
4
5
6
7
8
0
10
20
30
40
Temps de rétention en min.

Fig. 42

Nous avons vérifié, que les coefficients de proportionnalité K_P , K_L , K_E , K_T , reliant la masse de chacun des isomères à la surface du pic correspondante, étaient identiques car tous les corps sont isomères (C_{28} H_{44} O) ; ils ont donc la même probabilité de donner les mêmes réponses, pour une masse injectée égale ; nous avons réalisé une solution étalon dans laquelle les concentrations de chacun des isomères obtenus par la chromatographie sur colonne, sont bien connues par l'application de la formule suivante :

$$\varepsilon = \frac{A}{C\ell} \quad \text{d'où} \quad C = \frac{A}{\varepsilon\ell}$$

C est la concentration moléculaire

A est la densité optique, valeur fournie par les mesures au spectrophotomètre ultraviolet.

ℓ est le parcours optique de la cuve, en centimètre.

ε est le coefficient d'extinction moléculaire, déterminé pour chaque isomère, dans l'oxyde d'éthyle, par Rappoldt (11).

Ce mélange étalon est injecté dans le chromatographe, puis nous mesurons les surfaces de chacun des pics ; nous avons obtenu effectivement un pourcentage des isomères identique entre les mesures faites au spectrophotomètre ultraviolet et celles effectuée par la chromatographie en phase gazeuse.

4. - SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS. -

Nous avons admis, dans notre étude, que tous les termes de la matrice [a] dépendant du flux, étaient constants ; c'est ainsi que la fonction d'interaction f_{ij}, exprimant la transformation de l'espèce i vers l'espèce j (3.2.3.) :

$$f_{ij} = K_{ij} + K \cdot \Phi \cdot \Psi_{ij} \cdot \varepsilon_i$$

s'écrit, sous la forme la plus générale :

$$f_{ij} = f(\Phi, \Psi, \varepsilon) = \text{constante.}$$

S'il est possible de maintenir constante l'intensité Φ du rayonnement incident, il est, par contre, difficile d'assurer la constance des fonctions $f(\Psi, \varepsilon)$ qui dépendent des spectres particulaires qui règnent en chaque point du système, ainsi que des espèces présentes dans le milieu.

Dans le cas le plus général, il se produira, au cours de l'évolution, une variation simultanée de la composition du système et des flux et spectres particulaires locaux ; un certain nombre de fonctions contenues dans la matrice [a] varieront donc au cours du temps et l'on ne pourra pas observer une partie rectiligne dans les courbes d'évolution tracées en coordonnées semi-logarithmiques.

Ce problème de la dégradation du spectre incident, à l'intérieur d'une solution irradiée, ne nous a pas échappé ; nous avons cependant estimé qu'avec le type de rayonnement monochromatique utilisé, les photons émis par la source ultraviolette avec une énergie de 4,88 eV sont absorbés uniquement par effet photoélectrique ; la valeur de l'intensité de sortie est inférieure à celle de l'intensité de l'entrée, du fait de l'absorption, mais le spectre reste constant ; l'effet Compton est certainement négligeable devant l'effet photoélectrique car la probabilité pour que la désexcitation des molécules donne naissance à des photons d'énergie comprise entre 5,39 et 4 eV, correspondant respectivement aux longueurs d'onde de 2300 et 3100 Å, région spectrale où tous les isomères absorbent, nous parait faible ; à notre avis, les photons réémis à l'intérieur du milieu irradié ont une énergie insuffisante pour leur permettre de jouer un rôle photochimique.

Il n'est pas suffisant, pour obtenir une partie rectiligne dans la courbe d'évolution d'une espèce E_j, que le graphe vrai auquel appartient cette espèce soit linéaire et que la partie des fonctions ne dépendant pas des cardinaux des espèces (température, volume, pression, spectre particulaire) soit constante, comme nous venons de le supposer.

Il est nécessaire aussi que la plus petite, en valeur absolue, des valeurs propres de la matrice correspondante soit suffisamment différente des autres valeurs propres de cette matrice ; sinon, il restera, dans l'équation d'évolution d'une espèce E_j, et pour deux valeurs voisines λ_m et λ_1, une expression de la forme :

$$N_j = A_m \cdot e^{\lambda_m t} + A_1 \cdot e^{\lambda_1 t}$$

avec $A_m = \sum_{k=1}^{k=n} \gamma_{mjk} \cdot N_{ok}$ et $A_1 = \sum_{k=1}^{k=n} \gamma_{1jk} \cdot N_{ok}$

On voit facilement que si les coefficients A_m et A_1 sont du même ordre de grandeur, le second terme risque de n'être jamais tout à fait négligeable par rapport au premier, et l'on n'observera pas de partie rectiligne sur la courbe d'évolution tracée en coordonnées semi-logarithmiques.

Nous avons donc vérifié par le calcul que la plus petite valeur propre calculée λ_m, était très différente des autres valeurs propres dans chacun des trois graphes étudiés.

La mesure expérimentale de λ_m est effectuée avec des solutions très peu concentrées ($C = 2.10^{-5}$ M) ; elle est déterminée en suivant l'évolution d'une grandeur physique proportionnelle à une combinaison linéaire des concentrations des espèces, suivant la méthode exposée au paragraphe 3.2.4.a; les techniques expérimentales de dosage ne permettent pas, en effet, d'obtenir cette valeur par la mesure de la pente de la courbe d'évolution de chacun des isomères.

Bien que la concentration utilisée dans les solutions irradiées soit faible, le rayonnement incident est légèrement absorbé ; il nous a paru

nécessaire d'introduire un facteur correctif F, traduisant la décroissance du flux à l'intérieur des solutions :

$$F = \frac{1 - e^{-A_{(t)}}}{A_{(t)}}$$

avec A = densité optique à la longueur d'onde du rayonnement incident.

Ce facteur permet de connaitre l'intensité moyenne $\overline{I}_{(t)}$ dans la solution irradiée puisque l'intensité incidente $I_{o(t)}$ n'est utilisable, en toute rigueur, que dans un système d'épaisseur très faible ; les valeurs $A_{(t)}$ sont déterminées par les mesures expérimentales de la variation de la densité optique, en fonction du temps d'irradiation, à la longueur d'onde λ_i de la radiation incidente (λ_i = 2537 Å).

L'intensité moyenne se calcule alors, à partir des valeurs expérimentales ainsi obtenues, par la formule :

$$\overline{I}_{(t)} = I_{o(t)} \times F \qquad \text{ou} \qquad \overline{I}_{(t)} = I_{o(t)} \times \frac{1 - e^{-A_{(t)}}}{A_{(t)}}$$

Le passage de la variable t, temps d'irradiation, utilisable dans un système d'épaisseur très faible, à la variable τ, nécessaire pour linéariser le système que nous avons utilisé (voisin mais non identique au système d'épaisseur très faible puisqu'il y a un affaiblissement du flux incident dans le milieu d'irradiation) est donné par la formule :

$$\tau = \int_0^t F_{(t)}\, dt$$

La figure 43 donne les résultats expérimentaux obtenus avec la valeur τ en abscisse et les variations de la densité optique, en fonction du temps de l'irradiation, pour une longueur d'onde où les espèces extérieures au graphe vrai n'absorbent pas, en ordonnées.

La valeur λ_m est enfin calculée par la formule suivante :

$$\lambda_m = \frac{\text{Log } A_1 - \text{Log } A_2}{\tau_1 - \tau_2}$$

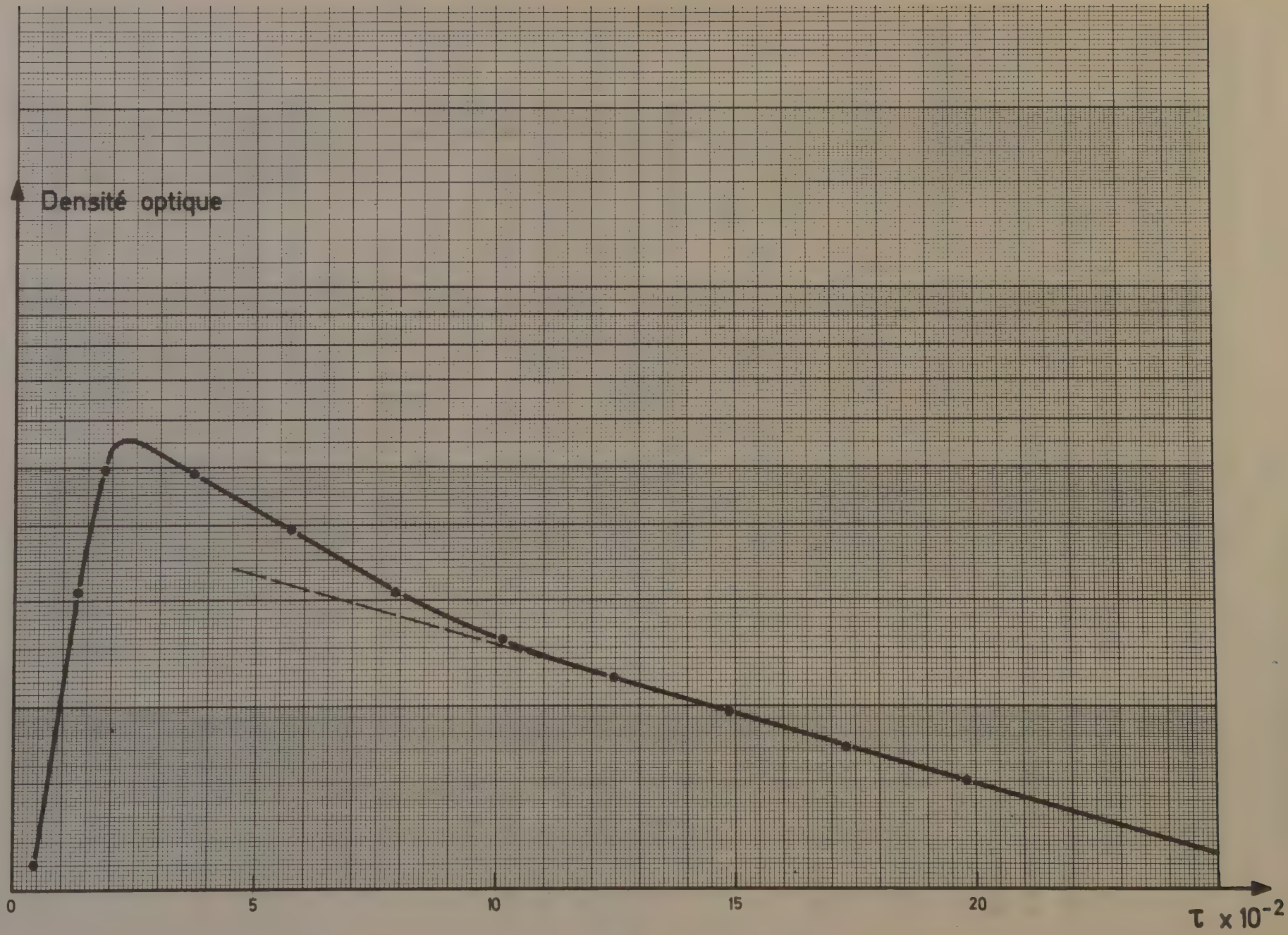


Fig. 43

A_1 et A_2 sont les densités optiques mesurées, correspondant à τ_1 et τ_2 respectivement.

Le Tableau XIII donne les valeurs de λ_m obtenues en irradiant séparément chacun des quatre isomères du graphe vrai avec un flux incident de $1,9\ 10^{15}$ photons/cm^2/sec.

Tableau XIII

Isomère irradié	λ_m
Ergostérol	- 0,27
Prévitamine	- 0,24
Lumistérol$_2$	- 0,30
Tachystérol$_2$	- 0,27

Aux erreurs expérimentales près, on voit que ces valeurs sont identiques ainsi que le laissait prévoir la théorie utilisée (§ 3.2.3.). Ceci est conforme à leur appartenance à un même graphe vrai, comme c'est le cas dans les trois schémas proposés.

4.1.- TRACE DES COURBES D'EVOLUTION DES DIFFERENTS ISOMERES.-

Nous savons que si la température, à l'intérieur de la solution irradiée est faible (inférieure à 5°C), les fonctions d'interaction thermique entre la prévitamine et la vitamine D_2 peuvent être négligées.

Dans ces conditions, que nous avons effectivement réalisées dans cette étude, toutes les fonctions d'interaction ne dépendent que de l'intensité du rayonnement.

La très faible quantité de matière, obtenue après l'irradiation ultraviolette d'une solution d'ergostérol de faible concentration ($c = 2.10^{-5}$ M), rendue homogène par une agitation vigoureuse, ne permet pas de doser séparément les différents isomères formés ; nous avons donc utilisé des solutions plus concentrées ($c = 1,25.10^{-2}$ M).

Le flux de photons incident est alors considérablement affaibli à l'intérieur du milieu d'irradiation, le facteur F caractérisant la décroissance du flux devient nul et les équations différentielles traduisant l'évolution des espèces ne sont plus linéaires ; la question que nous nous sommes posée, alors, a été de savoir si les compositions relatives mesurées expérimentalement, dans un système dont les équations ne sont pas linéaires, mais dont toutes les fonctions d'interactions sont proportionnelles à un même paramètre, le flux, correspondent aux valeurs calculées des vecteurs propres associés à la plus petite valeur λ_m , dans un système d'épaisseur très faible.

La réponse est affirmative ; puisque toutes les fonctions d'interaction sont proportionnelles à un même paramètre (l'effet de spectre et le passage thermique P→ D sont négligeables), que celui-ci soit le flux incident $\bar{\Phi}_o$, non perturbé dans le milieu irradié à faible concentration, ou bien le flux moyen $\bar{\Phi}_m$ que l'on ne peut ni calculer, ni mesurer, qui règne à l'intérieur d'une solution concentrée, les fonctions d'interactions donneront les mêmes compositions relatives dans les deux cas ; en effet, on ne change pas la valeur des vecteurs propres d'une matrice en multipliant chacun de ses termes par un même facteur ($\bar{\Phi}_o$ ou $\bar{\Phi}_m$) ; par contre, si l'on opère à une température suffisamment élevée pour permettre le passage thermique de la prévitamine à la vitamine D_2, on fait apparaître dans le graphe des fonctions d'interactions ne dépendant pas du rayonnement (K_{PD} et K_{DP}), et les vecteurs propres varieront alors lorsque l'intensité moyenne du flux de photons variera à l'intérieur du système irradié.

Il nous semble normal de définir le régime permanent d'évolution, qui est la partie de la courbe d'évolution qui se traduit par une fonction rectiligne en coordonnées semi-logarithmiques, d'une façon différente de celle qui a été adoptée dans le cas général (§ 3.2.3).

Les espèces d'un graphe exotrope vrai sont en régime permanent d'évolution lorsque leurs concentrations relatives sont constantes.

Les deux définitions sont équivalentes car quelle que soit la forme de la somme d'exponentielles régissant l'évolution des espèces d'un graphe vrai, elle sera la même pour chacune des espèces du graphe vrai dès que le régime permanent d'évolution, en couche mince, ou le régime asymptotique en couche épaisse sera atteint.

De cette façon,il est possible d'atteindre le vecteur propre tout en travaillant dans des conditions non linéaires.

Les résultats expérimentaux sont donnés par la figure 44 ; les solutions d'ergostérol, dans l'oxyde d'éthyle, ont une concentration de $1,25.10^{-2}$ M ; elles sont irradiées avec un flux incident de $1,2.10^{15}$ photons/cm^2/sec ; l'analyse quantitative est effectuée par la chromatographie en phase gazeuse (§ 3.3.7) ; dix mesures ont été effectuées pour chacun des points expérimentaux notés sur la figure 44.

4.2.- GRAPHE REACTIONNEL LE PLUS PROBABLE.-

Le tableau XIV donne les valeurs calculées, à l'aide du programme Fortran décrit dans l'Annexe 3, de la valeur propre minimum λ_m et des vecteurs propres associés ; il donne également, colonne 5, les valeurs expérimentales.

Tableau XIV

	Graphe I	Graphe II	Graphe III	Graphe expérimental
Valeur propre minimum λ_m	- 0,019	- 0,907	- 0,068	- 0,27 ± 0,03
Composition relative en %				
Ergostérol	2,10	2,36	2,44	1,18 ± 0,05
Prévitamine	19,00	18,00	21,90	22,06 ± 0,3
Tachystérol$_2$	67,54	77,91	73,70	74,66 ± 0,3
Lumistérol$_2$	11,35	1,72	1,86	2,04 ± 0,08

Ce tableau montre que le graphe I, dont la structure interne comporte un circuit, possède des valeurs de λ_m et de compositions relatives trop différentes de celles obtenues expérimentalement ; ce graphe est donc à éliminer.

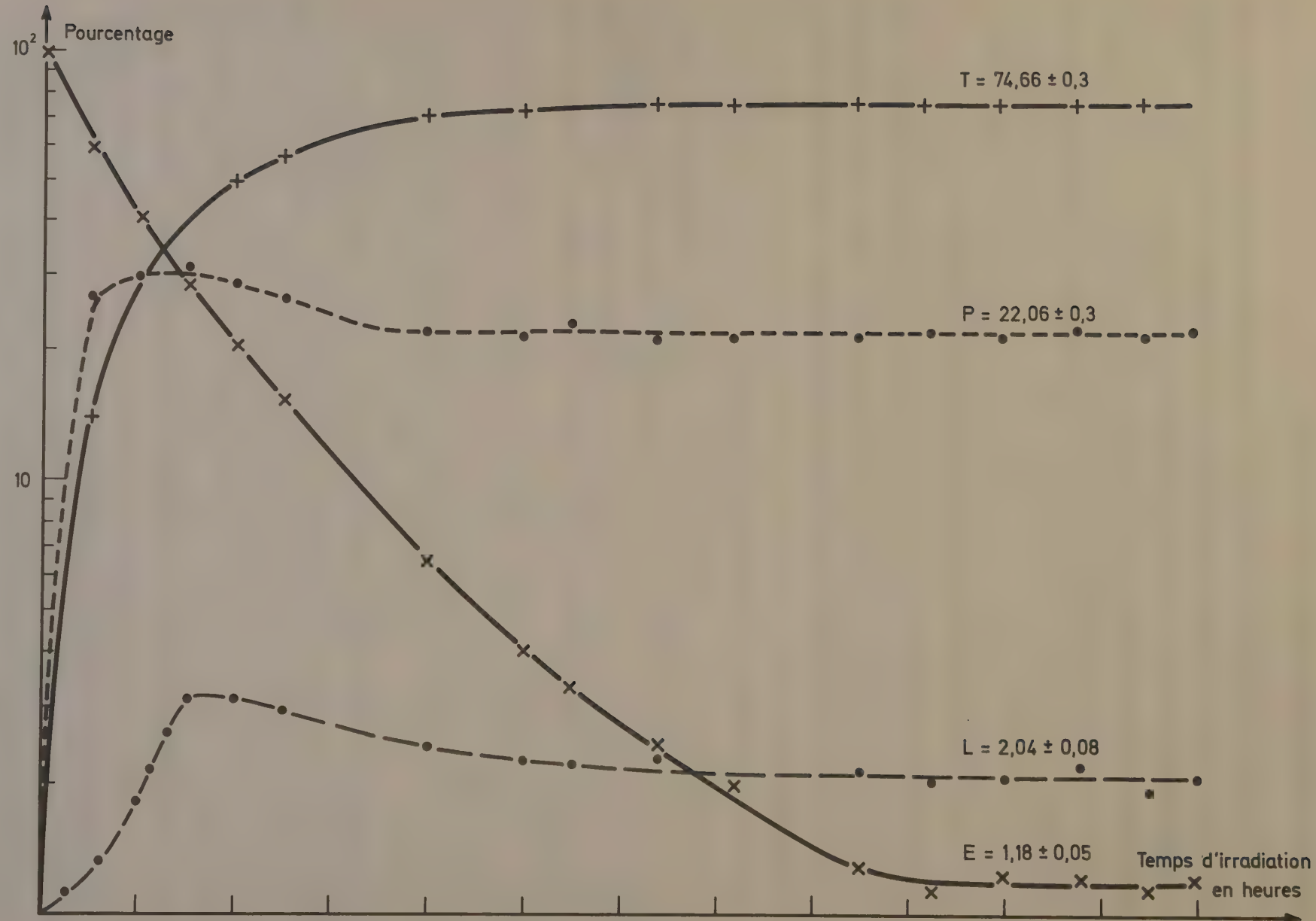

Pourcentage
10^2
10
T = 74,66 ± 0,3
P = 22,06 ± 0,3
L = 2,04 ± 0,08
E = 1,18 ± 0,05
Temps d'irradiation en heures
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110

Fig. 44

Nous remarquons, en outre, que la valeur propre minimum λ_m, déterminée expérimentalement, est éloignée des valeurs calculées pour les trois graphes ; c'est en effet, une des deux méthodes que nous avons utilisées pour la discrimination entre plusieurs graphes, mais elle est trop sujette à l'influence des fonctions extérieures d'un graphe vrai pour permettre, à elle seule, de différencier plusieurs graphes en présence.

Par contre, on voit immédiatement sur le tableau, que le graphe expérimental se situe entre les graphes calculés II et III, d'après la valeur de λ_m, et que les compositions relatives, calculées et expérimentales, de la prévitamine et du tachystérol$_2$ sont voisines ; les différences observées pour l'ergostérol et le lumistérol$_2$ découlent du fait que Sanders (10) a affecté la même valeur de rendement quantique pour la formation du 7-déhydrocholestérol et du lumistérol$_3$ à partir d'une solution de prévitamine D_3 irradiée (la littérature (109) admet une totale identité entre les deux schémas réactionnels photochimiques : Ergostérol-Vitamine D_2 et 7-déhydrocholestérol-Vitamine D_3) ; cet auteur a trouvé en effet, que pour le même taux de conversion d'une solution de prévitamine D_3 irradiée, les tâches du 7-déhydrocholestérol (précurseur de la vitamine D_3) et du lumistérol$_3$ apparaissaient, après révélation par un agent chimique d'un chromatogramme en couches minces, avec la même intensité. Nous pensons, d'après nos résultats expérimentaux, que ces deux rendements quantiques, difficiles à déterminer, ne sont pas égaux ; nous avons donc fait varier ces deux facteurs pour obtenir des valeurs calculées de la composition relative voisines des valeurs expérimentales dans les graphes II et III ; ces deux graphes restant en compétition, ont la même configuration interne ; dans ce cas, l'interprétation des résultats expérimentaux se ramène au problème suivant : trouver un graphe dont les valeurs calculées des compositions relatives et de la valeur propre minimum λ_m soient les plus proches des valeurs expérimentales ; ce graphe doit respecter, en outre, les contraintes que sont les rendements quantiques de disparition des espèces ; ces deux méthodes (λ_m et compositions relatives) conjuguées doivent déterminer le même graphe aux erreurs expérimentales près. Si cette convergence des deux méthodes a lieu, nous avons une présomption favorable pour que le graphe trouvé soit proche du graphe réel.

Cette procédure revient à étudier les solutions possibles pour un graphe vrai à quatre espèces dont toutes les fonctions ne dépendent que du rayonnement, comme dans les graphes II et III ; il est alors nécessaire de raisonner sur la matrice des grandeurs $q_{ij} = \varepsilon_i \cdot \varphi_{ij}$, qui déterminent les propriétés du graphe à quatre espèces. Dans l'expression de la fonction d'interaction exprimant la transformation de l'espèce i vers l'espèce j : $f_{ij} = K. \bar{\Phi}. q_{ij}$, le coefficient de q_{ij} est constant pour tous les éléments ; les matrices $[\varphi]$ que nous devons déterminer, pour chacun des graphes II et III, sont les suivantes :

Graphe II

$$[\varphi] = \begin{bmatrix} -(q_{Ee}+q_{EP}) & +q_{PE} & +q_{TE} & +q_{LE} \\ +q_{EP} & -(q_{PE}+q_{PL}+q_{PT}) & +q_{TP} & +q_{LP} \\ +q_{ET} & +q_{PT} & -(q_{Te}+q_{TP}) & +q_{LT} \\ +q_{EL} & +q_{PL} & +q_{TL} & -q_{LP} \end{bmatrix}$$

Graphe III

$$[\varphi] = \begin{bmatrix} -q_{EP} & +q_{PE} & +q_{TE} & +q_{LE} \\ +q_{EP} & -(q_{PE}+q_{PT}+q_{PL}+q_{PTox}) & +q_{TP} & +q_{LP} \\ q_{ET} & +q_{PT} & -q_{TP} & +q_{LT} \\ q_{EL} & +q_{PL} & +q_{TL} & +q_{LP} \end{bmatrix}$$

en conservant, bien entendu, les contraintes imposées par les valeurs expérimentales des rendements quantiques, déterminées par Rappoldt (11).

$$\varphi_E = \varphi_{Ee} + \varphi_{EP} + \varphi_{ET} + \varphi_{EL} = \text{constante}$$

$$\varphi_P = \varphi_{PE} + \varphi_{Pe} + \varphi_{PT} + \varphi_{PL} = \text{constante}$$

$$\varphi_T = \varphi_{TE} + \varphi_{TP} + \varphi_{Te} + \varphi_{TL} = \text{constante}$$

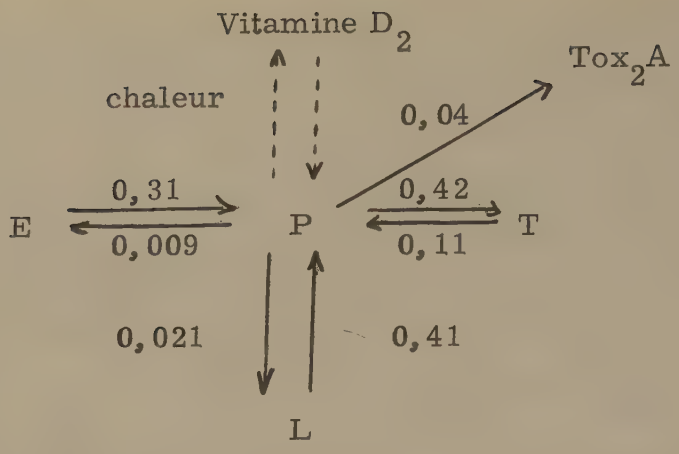
$$\varphi_L = \varphi_{LE} + \varphi_{LP} + \varphi_{LT} + \varphi_{Le} = \text{constante}$$

Y-a-t-il une relation biunivoque entre la plus petite valeur propre λ_m et le vecteur propre (ou les compositions relatives) correspondant lorsque les éléments q_{ij} varient en tenant compte des contraintes précédentes ? Autrement dit, connaissant les valeurs expérimentales de λ_m et des compositions relatives, est-il possible d'obtenir une matrice $[\varphi]$ unique dans chacun des deux graphes, ou existe-t-il une matrice $[\varphi]$ unique pour l'un des deux graphes seulement, dont les valeurs calculées soient cohérentes avec les valeurs expérimentales ?

Pour répondre à cette question, nous avons procédé numériquement, par ajustement des fonctions q_{ij} dans chacun des deux graphes restant en présence, en conservant, bien entendu, les contraintes imposées ; nous avons donc fait varier, d'une part, les deux rendements quantiques φ_{PE} et φ_{PL}, d'autre part, les rendements quantiques des fonctions extérieures φ_{Ee} et φ_{Te}, pour le graphe II, et $\varphi_{P\ Tox_2A}$ pour le graphe III ; cette dernière donnée, $\varphi_{P\ Tox_2A}$, est inconnue ; nous lui avons affecté, dans nos calculs, une valeur comprise entre 0,01 et 0,05, soustraite de la valeur du rendement quantique prévitamine-tachystérol$_2$ afin de conserver toujours les valeurs des rendements quantiques totaux de chacune des espèces, déterminées par Rappoldt (11) ; ceci limite en fait le nombre de graphes à étudier ; parmi ceux-ci, quelques graphes présentaient une valeur propre λ_m voisine de celle que nous avons obtenue expérimentalement d'où une première discrimination ; une seconde discrimination est accomplie en comparant, ensuite, les valeurs calculées des compositions relatives de ces graphes avec les valeurs expérimentales.

Cette méthode a été rendue possible par le nombre réduit des fonctions q_{ij} variables dans chacun des graphes II et III.

Le graphe ci-dessous est le seul qui présente des résultats pour les valeurs <u>calculées</u> de λ_m et des compositions relatives, identiques à ceux que nous avons obtenues expérimentalement :



Le tableau XV permet une comparaison immédiate entre les valeurs calculées et expérimentales.

Tableau XV

Graphe proposé Valeurs calculées	Valeurs expérimentales
$\lambda_m = -0,277$	$\lambda_m = -0,27 \pm 0,03$
E % = 1,15	E % = 1,18 ± 0,05
P % = 22,07	P % = 22,05 ± 0,30
T % = 74,75	T % = 74,66 ± 0,35
L % = 2,02	L % = 2,04 ± 0,08

Dans le cas de graphes pouvant comporter des fonctions extérieures sur toutes les classes, il est sans aucun doute nécessaire d'utiliser une méthode différente qui peut faire également appel aux caractéristiques du régime permanent d'évolution et du "nombre d'extrapolation", telle la méthode actuellement étudiée par Abillon (110) ; (on appelle "nombre d'extrapolation", la somme des éléments de la première colonne de la matrice G_m, correspondant au régime permanent).

Par rapport aux méthodes précédentes, valables uniquement dans le régime permanent d'évolution, on peut aussi utiliser une méthode plus générale, proposée par P. Delattre (1), qui doit permettre, sans faire d'hypothèses sur les fonctions d'interactions, et en utilisant uniquement les mesures faites sur l'occupation des différentes classes au cours du temps, de déterminer la structure d'un système linéaire ; les mesures sont alors effectuées dans le régime transitoire de début d'irradiation ; malheureusement, le programme de calcul nécessaire présente un certain nombre de difficultés non encore résolues.

5. - CONCLUSION. -

Nous avons étudié le graphe photochimique de l'ergostérol par une méthode différente de celles utilisées précédemment. La première partie a trait aux méthodes et aux techniques de séparation et de dosage employées pour l'élaboration des trois schémas réactionnels antérieurs, proposés dans la littérature.

Nous décrivons ensuite la méthode que nous avons utilisée dans la présente étude ; nous l'avons emprunté à la théorie générale des systèmes moléculaires proposée par P. Delattre (1) et nous avons jugé personnellement qu'elle était adéquate pour lever l'ambiguité entre les trois schémas réactionnels.

Cette méthode a été décrite, après un rappel du formalisme utilisé dans la théorie des graphes et de la contribution de P. Delattre concernant la notion de graphe vrai et les propriétés des quatre types possibles de graphes vrais, en étudiant un système moléculaire linéaire quelconque ; nous avons ensuite appliqué cette méthode à la résolution théorique du système photochimique de l'ergostérol ; l'étude analytique a montré que la courbe d'évolution, en fonction du temps, pour chacune des espèces d'un graphe vrai tend vers une partie rectiligne en coordonnées semi-logarithmiques : cette partie de la courbe d'évolution est appelée régime permanent d'évolution ; la pente de la partie rectiligne ainsi obtenue est égale à la valeur propre de valeur absolue minimum λ_m et elle est la même pour toutes les espèces d'un graphe vrai quelconque ; de plus, pour le type de graphe vrai, la composition relative des espèces reste constante, dans le régime permanent d'évolution.

Nous avons donc calculé, par un programme Fortran spécialement mis au point, les valeurs de λ_m et des compositions relatives pour chacun des trois derniers graphes proposés ; le protocole expérimental a ainsi pu être défini avec précision puisqu'il nous a suffit ensuite de comparer les valeurs calculées et les valeurs expérimentales de λ_m et des compositions relatives pour déterminer le graphe le plus probable parmi les trois proposés.

La deuxième partie est donc consacrée aux méthodes expérimentales d'analyse et de dosage qui nous ont permis de mesurer les valeurs de λ_m et des compositions relatives.

Après une description des techniques d'irradiation que nous avons utilisées, nous décrivons dans cette partie les méthodes expérimentales que nous avons élaborées pour la séparation et le dosage des isomères photochimiques.

Ces méthodes font appel aux différentes techniques chromatographiques (couche mince, colonne, phase gazeuse) que nous avons adaptées à notre cas particulier de la séparation de plusieurs espèces isomères ; la chromatographie sur couche mince (111) nous a permis d'obtenir la séparation de cinq isomères ; la chromatographie sur colonne, effectuée avec un solvant d'élution identique à celui utilisé dans le milieu d'irradiation (ce qui présente une importance certaine dans l'analyse de ces corps thermolabiles) permet également la séparation de cinq isomères ; la chromatographie en phase gazeuse, enfin, a mis en évidence une isomérisation thermique supplémentaire et la séparation suffisante de huit isomères ; ces trois méthodes n'avaient donné lieu jusqu'à présent selon la littérature récente, qu'à la séparation d'un maximum de cinq isomères (10) (24) (26) ; nous avons appliqué également ces méthodes analytiques, que nous avons mises au point, à l'étude de la photochimie de la vitamine D_2, étude que nous avons brièvement abordée, et mis en évidence la formation de nouveaux isomères.

Les différentes et nombreuses précautions expérimentales que nous avons prises sont traitées dans cette partie, et les spectres ultraviolets et infrarouges, peu nombreux dans la littérature, sont donnés pour chacun des isomères à l'état pur.

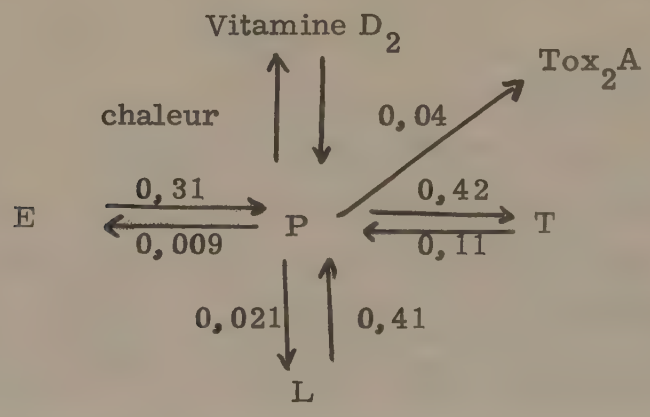
Nous exposons ensuite la méthode quantitative que nous avons utilisée, en expliquant les raisons qui ont motivé notre choix, et les valeurs des compositions relatives des espèces que cette méthode a permis de déterminer.

Enfin, la synthèse des résultats obtenus avec la méthode utilisée montre, par une comparaison des valeurs calculées et expérimentales, que le graphe n° I, comportant une formation directe de lumistérol$_2$ à partir du tachystérol$_2$, est à éliminer ; par un ajustement des fonctions d'interactions, mais en

conservant par différence les valeurs des rendements quantiques données dans la littérature, effectué pour chacun des deux autres graphes restant en présence, nous avons finalement proposé un graphe dont les valeurs propres et les compositions relatives sont voisines de celles que nous avons déterminées expérimentalement ; ce graphe a la même structure que le graphe III mais nous avons modifié deux valeurs de rendements quantiques et fixé une valeur, jusqu'ici inconnue, au rendement quantique de transformation de la prévitamine au toxistérol$_2$A.

De tous les graphes étudiés, issus des graphes II et III, envisageables, c'est le seul qui présente des valeurs calculées de λ_m et des compositions relatives homogènes avec nos résultats expérimentaux ; la méthode que nous avons utilisée dans cette étude est donc bien adaptée à la recherche d'un schéma réactionnel probable parmi plusieurs schémas en présence.

Le graphe que nous proposons est le suivant :



Nous indiquons sur ce schéma les valeurs des rendements quantiques.

ANNEXE I

SEPARATION DES SUPRASTEROLS (I et II) ET DE LA VITAMINE D_2(96)

I. - INTRODUCTION. -

Par une irradiation prolongée d'une solution d'ergostérol avec une lampe à vapeur de mercure et à une température de 75°C, Windaus (97) obtint deux substances, isomères de l'ergostérol, le suprastérol$_2$I et le suprastérol$_2$II ; il effectua la séparation de ces corps par un processus complexe, faisant intervenir la différence de solubilité entre les deux esters allophaniques, l'ester allophanique du suprastérol$_2$II étant le plus soluble.

Ces deux corps sont les produits finaux obtenus par l'irradiation ultraviolette de l'ergostérol, à une température suffisamment élevée pour permettre le passage thermique de la prévitamine à la vitamine D_2. Ils sont aussi les produits primaires obtenus par l'irradiation ultraviolette de la vitamine D_2 (fig.45), les toxistérols n'étant pas produits par l'intermédiaire de la vitamine D_2 (98).

La structure de ces deux corps n'a pas encore été établie avec certitude (99), mais on sait (100) qu'ils ne précipitent pas avec la digitonine, contrairement à l'ergostérol, qu'ils possèdent un groupe hydroxyle et qu'ils forment des esters ; le noyau B , ouvert dans la prévitamine, le tachystérol$_2$ et la vitamine D_2 , doit être fermé dans les deux suprastérols ; ils possèdent trois doubles liaisons et quatre noyaux, comme le lumistérol$_2$ et le pyrocalciférol$_2$.

II. - PARTIE EXPERIMENTALE. -

Nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse.

La vitamine D_2 et les suprastérols$_2$ I et II ne sont pas séparés sur des colonnes métalliques remplies avec une phase stationnaire apolaire (JXR et SE 30).

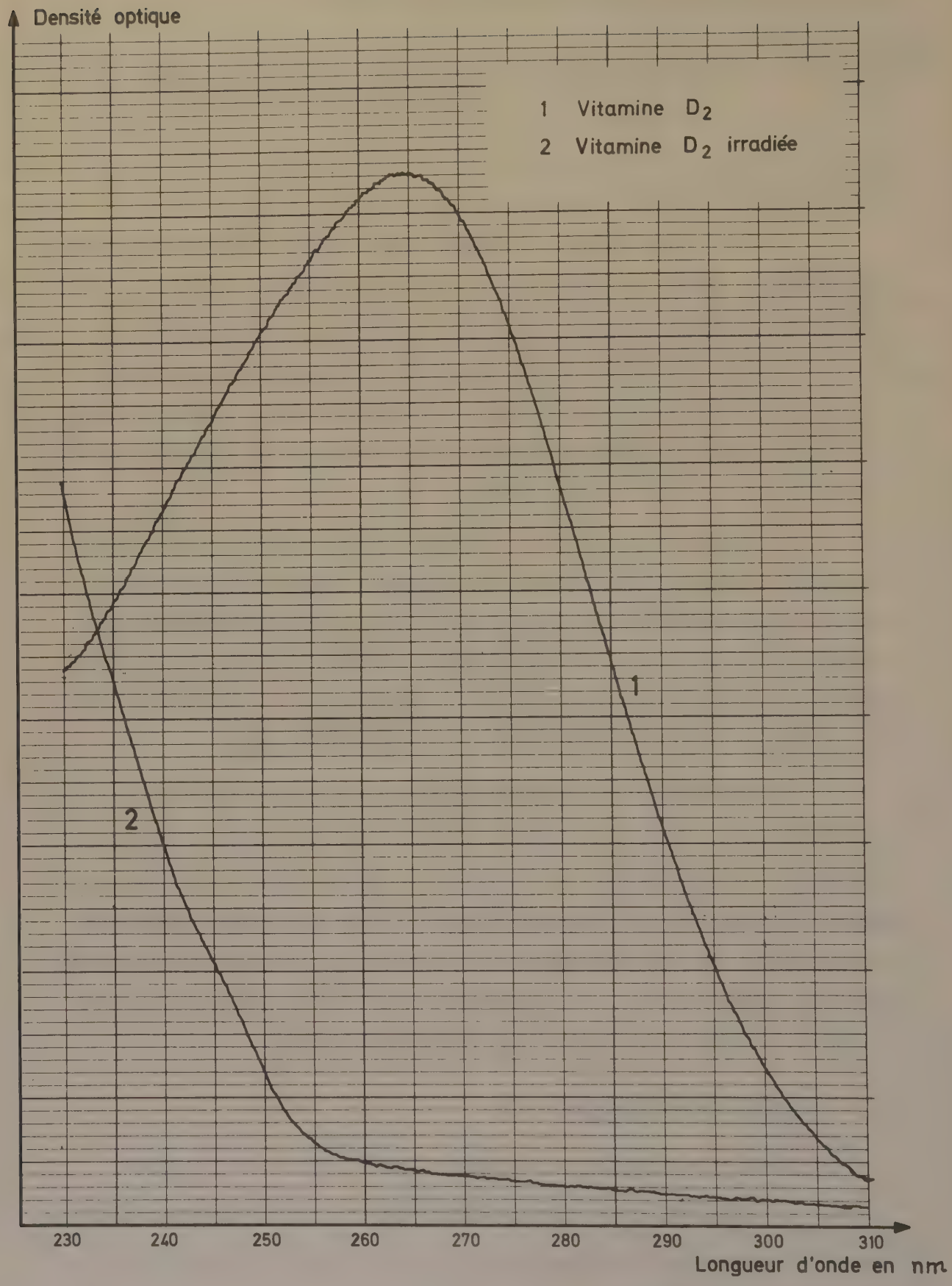

Densité optique
1 Vitamine D_2
2 Vitamine D_2 irradiée
1
2
230
240
250
260
270
280
290
300
310
Longueur d'onde en nm

Fig. 45

Nous avons donc utilisé la méthode élaborée par Sweeley (101) pour l'analyse des carbohydrates et dérivés.

Dans une solution contenant 10 à 20 milligrammes de résidu de vitamine D_2 surirradiée, nous avons ajouté 1 ml de pyridine, 0,2 ml d'hexamethyldisilazane et 0,1 ml de triméthylchlorosilane. Après une agitation vigoureuse pendant trois minutes, nous injectons directement 0,5 µl de cette solution dans le chromatographe (Aérograph modèle 1520-B). Avec les colonnes remplies avec les phases stationnaires SE 30 et JXR, la séparation était améliorée, de même qu'avec les phases QF 1 et XE 60, plus polaires. Mais si l'on utilise la phase DC 550, la séparation des deux suprastérols devient complète (fig. 46).

Les temps de rétention sont indiqués dans le Tableau XVI ci-dessous :

Tableau XVI

Phases stationnaires utilisées	T_R - Suprastérol$_2$I TMSE	T_R Suprastérol$_2$II TMSE	Rapport des surfaces $\frac{\text{Suprastérol}_2\text{I}}{\text{Suprastérol}_2\text{II}}$
SE 30	24 mn 18 s.	25 mn 30 s.	2,3
JXR	27 mn	28 mn 18 s.	2,2
DC 550	44 mn 10 s.	51 mn	2,6

Les conditions opératoires sont les suivantes :

SE 30 : colonne métallique de dimensions : 1,50 m x 2,16 mm, remplie avec la phase stationnaire SE 30 à 5 % sur chrom W - A/W/DMCS 60/80.
Température de la colonne : 250 °C.

JXR : colonne métallique de dimensions : 1,80 m x 2,16 mm, remplie avec la phase stationnaire JXR à 3 % sur gas chrom P 100/120.
Température de la colonne : 250°C.

DC 550 : colonne métallique de dimensions : 1,80 m x 2,16 mm, remplie avec la phase stationnaire DC 550 à 3 % sur gas chrom P 100/120.
Température de la colonne : 240°C.

Les températures injecteur et détecteur sont égales à 300°C.

Les débits de l'air, de l'hélium et de l'hydrogène sont respectivement de 250, 20 et 20 ml/min.

Enfin, en utilisant une colonne remplie de la phase DC 550 et une température du four égale à 235°C, un mélange de vitamine D_2 non irradiée et de vitamine D_2 surirradiée, sous la forme estérifiée, montre une séparation très nette entre le pyrocalciférol$_2$, le suprastérol$_2$I, le suprastérol$_2$II et l'isopyrocalciférol$_2$ (fig.47).

Les temps de rétention de ces isomères sont respectivement de : 43 mn 30 s, 50 mn 40 s, 54 mn 30 s et 69 mn 30 s.

Conclusion. -

Le fait que les deux suprastérols et le pyrocalciférol$_2$ (ainsi que le lumistérol$_2$) ne puissent pas être séparés sur des phases stationnaires apolaires, à l'état libre, est une confirmation de la grande analogie structurale de ces composés.

De même que Westerhof et Buissman (34), Shaw et Jefferies (29), nous n'avons pas mis en évidence un suprastérol$_2$III hypothétique (102).

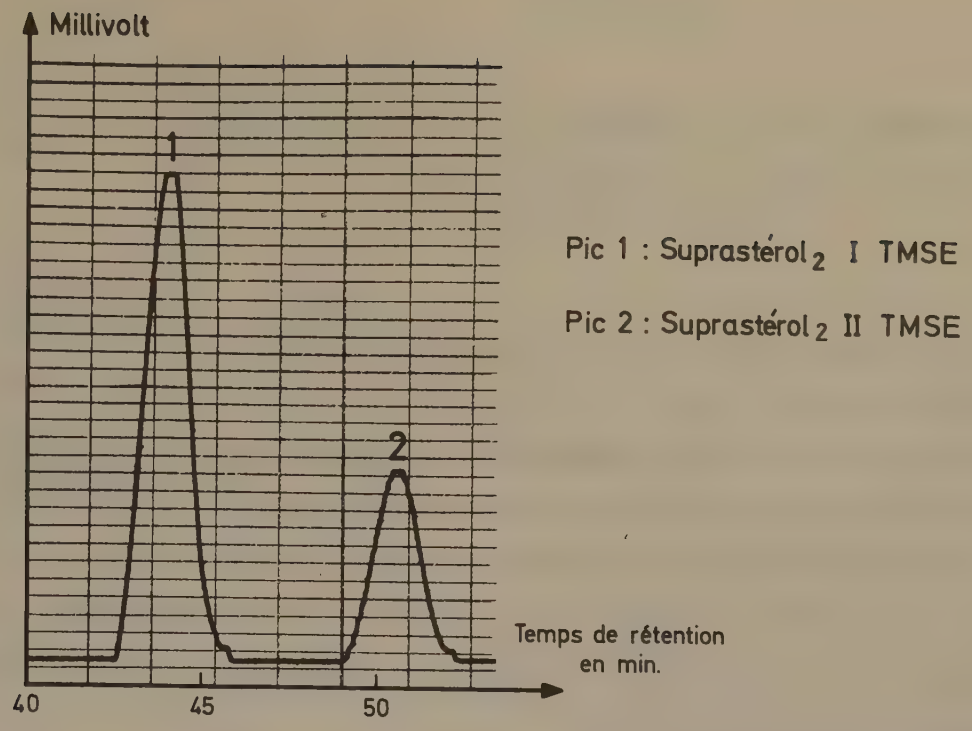

Millivolt
1
2
Pic 1 : Suprastérol 2 I TMSE
Pic 2 : Suprastérol 2 II TMSE
Temps de rétention en min.
40
45
50

Fig.46

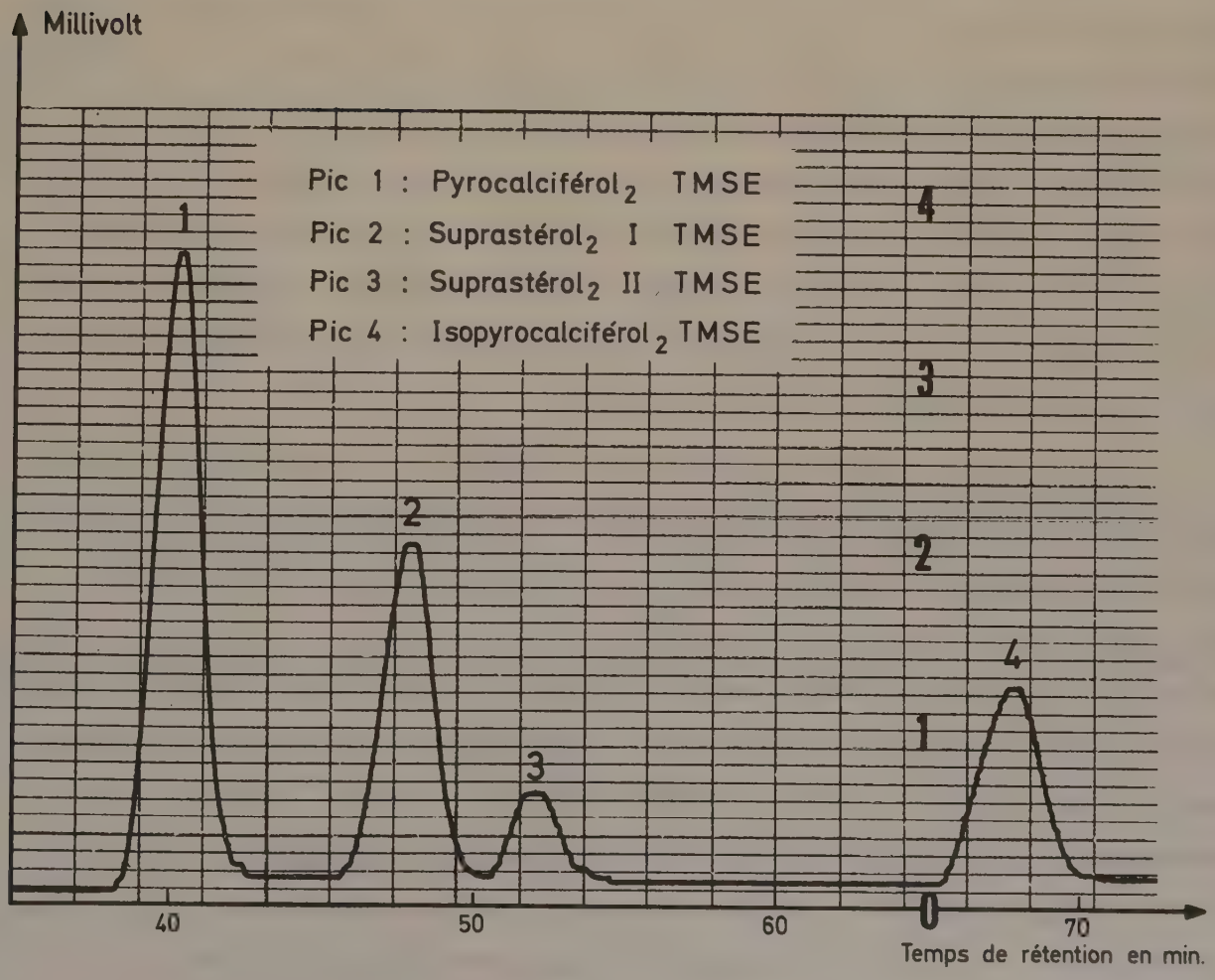

Millivolt
Pic 1 : Pyrocalciférol 2 TMSE
Pic 2 : Suprastérol 2 I TMSE
Pic 3 : Suprastérol 2 II TMSE
Pic 4 : Isopyrocalciférol 2 TMSE
1
2
3
4
4
3
2
1
0
40
50
60
70
Temps de rétention en min.

Fig. 47

ANNEXE 2

PHOTOCHIMIE DE LA VITAMINE D_2 - MISE EN EVIDENCE DE NOUVEAUX ISOMERES.

L'isomérization photochimique de la vitamine D_2 a été l'objet de travaux de la part de Velluz (3), Westerhof (34), Windaus (97), Green (102), Laquer (103), Setz (104) et Linsert (105) ; Verloop a effectué une étude sur l'isomérization de la prévitamine, du tachystérol$_2$, et de la vitamine D_2 par l'intermédiaire de réactions catalysées par l'iode, agent chimique favorisant les réactions cis-trans; il a ainsi mis en évidence la transformation isomérique de la prévitamine en tachystérol$_2$ (5), et le passage de la cis-vitamine D_2 à la trans-vitamine D_2 (106, 107).

L'utilisation des méthodes chromatographiques que nous avons mises au point pour la photochimie de l'ergostérol nous a permis d'étudier la photochimie de la vitamine D_2 d'une manière analytique différente de celle utilisée par les auteurs précédemment cités ; différentes solutions de vitamine D_2 , dans l'oxyde d'éthyle, sont soumises à un rayonnement ultraviolet émis par une source à vapeur de mercure à haute pression équipée d'un filtre dont le spectre d'absorption est donné en figure 17. La pureté des solutions, avant chaque irradiation, est vérifiée par la chromatographie sur couche mince et par la chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons suivi l'évolution photochimique de la vitamine D_2 pour des durées d'irradiation comprises entre 5 minutes et 24 heures ; la figure 48 montre les résultats obtenus par la chromatographie sur couche mince, avec des solutions faiblement irradiées (entre 5 mn et 90 mn) ; le support utilisé est le silicagel (Merck réf. 5715) ; on distingue nettement la formation rapide de deux isomères bien séparés ; nous avons alors procédé à différents essais, toujours sur le même support, avec des solutions irradiées plus longtemps (5 , 15 , 30 , 60 , 90 et 120 minutes) ; ces essais nous ont apporté la preuve supplémentaire, qu'effectivement, dès les premières minutes d'une irradiation, la vitamine D_2 donnait bien naissance à deux isomères

ABSORBANT : Silicagel
réf. Merck 5715

SOLVANTS { Tétrachlorure de Carbone : 20
Acétone : 1

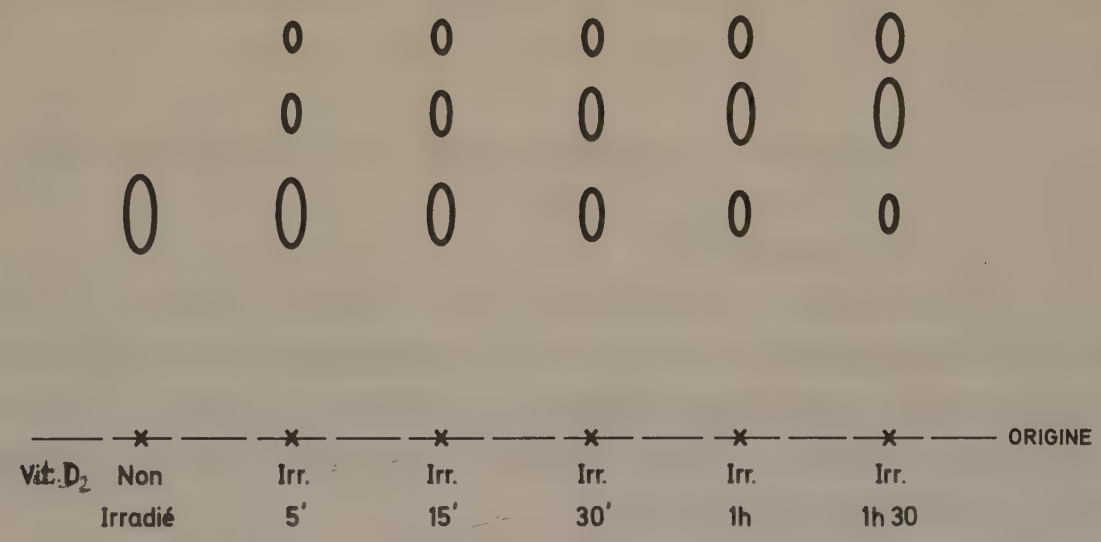


Fig. 48

photochimiques ; le solvant utilisé est un mélange de tétrachlorure de Carbone - Acétone (20 : 1) et les irradiations sont effectuées à une température voisine de 10°C, le passage de la vitamine D_2 à la prévitamine, et donc aux isomères du graphe vrai, est alors exclu.

La chromatographie sur colonne de dimensions 57 cm x 1 cm, remplie avec un mélange de 88 % de Silicagel et 12 % d'Alumine, nous a ensuite permis de recueillir des quantités suffisantes de chaque isomère pour l'obtention des spectres ultraviolets ; pour une faible durée d'irradiation (15 à 20 minutes), nous obtenons, également par cette méthode, deux isomères élués avant la vitamine D_2, mais dont le premier a une concentration trop faible pour une analyse correcte en spectrophotométrie ultraviolette (fig.49) ; par contre, le spectre ultraviolet du second corps élué est donné en figure 50 ; il est identique à celui de la 5,6-trans-6,7 s trans vitamine D_2, obtenu par Verloop (106, 107) avec l'iode comme agent chimique facilitant l'isomérization entre la cis et la trans- vitamine D_2.

Il nous semble donc, d'après nos résultats, que le rayonnement ultraviolet permette également cette transformation cis-trans, bien qu'un ouvrage récent de Sebrell et Harris (108), donne le schéma suivant :

$$\text{cis-Vitamine } D_2 \underset{h\nu}{\overset{I_2}{\rightleftharpoons}} \text{5,6 trans-Vitamine } D_2$$

Pour une durée d'irradiation de 1h30, les deux isomères, révélés par la chromatographie sur couche mince, et analysés par la chromatographie sur colonne (fig.51) ont leurs spectres ultraviolets donnés dans la figure 52 ; on remarque la présence, dans la figure 51 , d'un troisième corps formé en quantité insuffisante pour l'analyse.

Nous avons enfin analysé des solutions de Vitamine D_2 irradiées 12 et 24 heures ; nous obtenons quatre nouveaux isomères, élués par la chromatographie sur colonne, et leurs spectres d'absorption ultraviolette sont donnés dans la figure 53 .

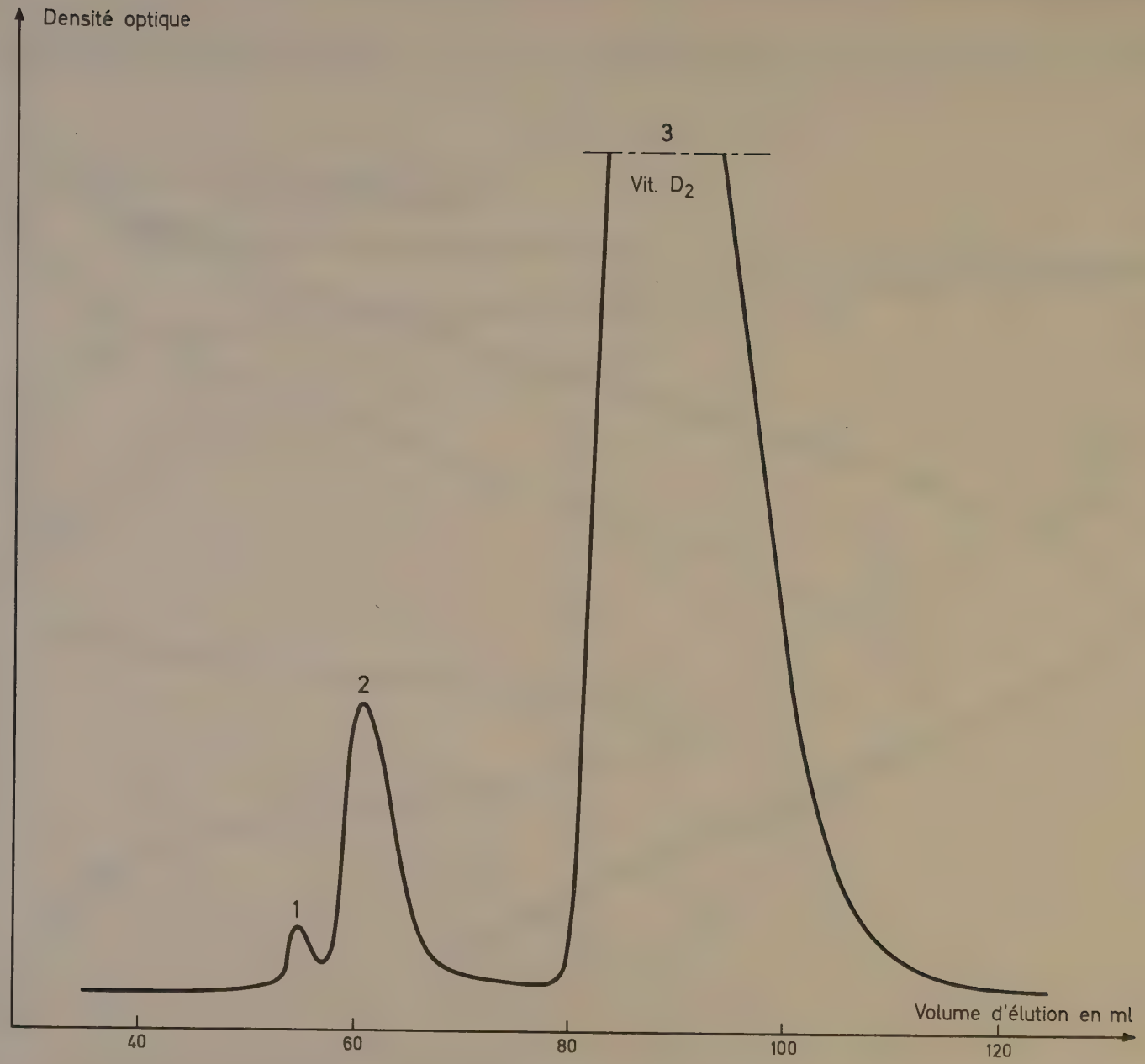

Densité optique
3
Vit. D_2
2
1
Volume d'élution en ml
40
60
80
100
120

Fig. 49

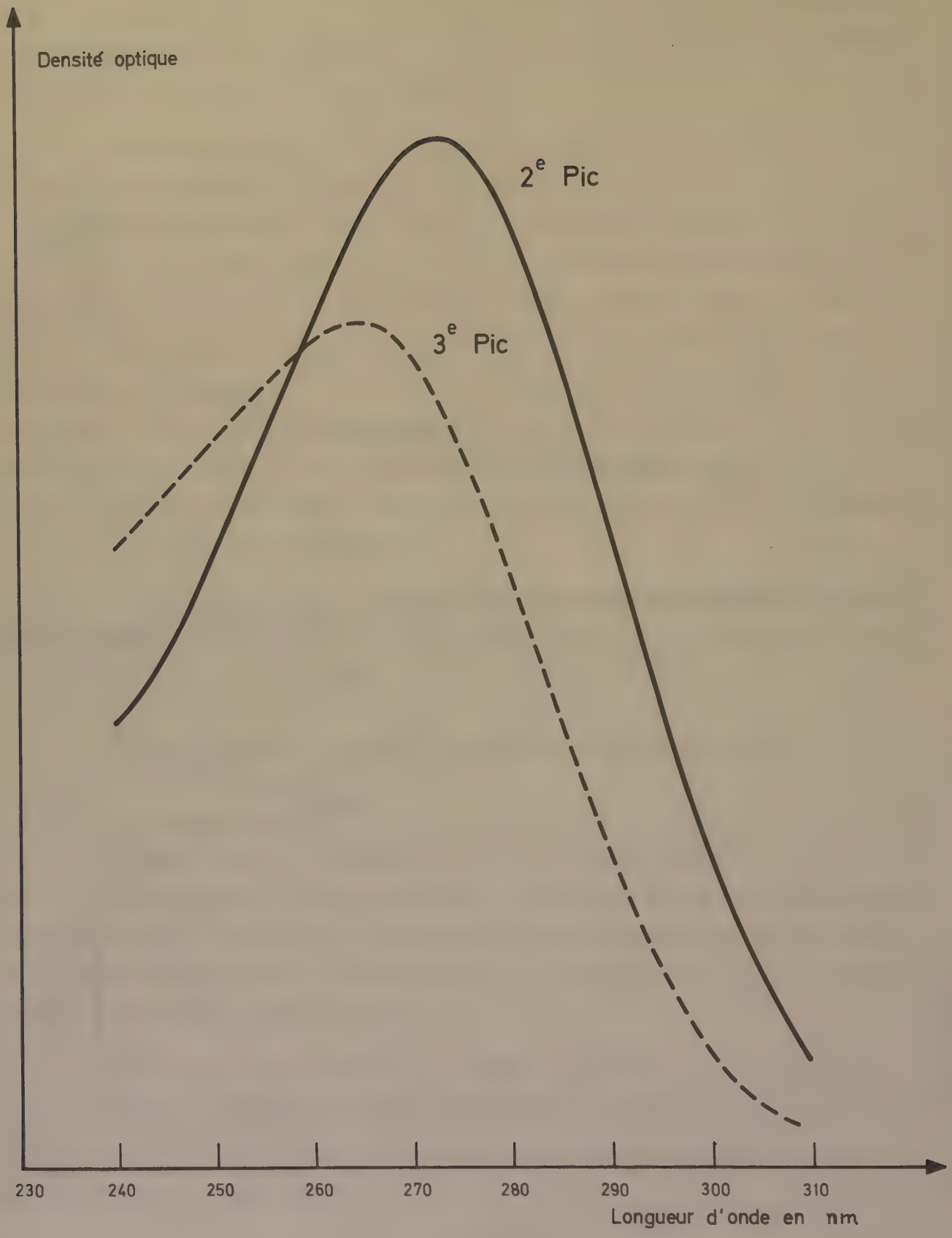

Densité optique
2e Pic
3e Pic
230
240
250
260
270
280
290
300
310
Longueur d'onde en nm

Fig. 50

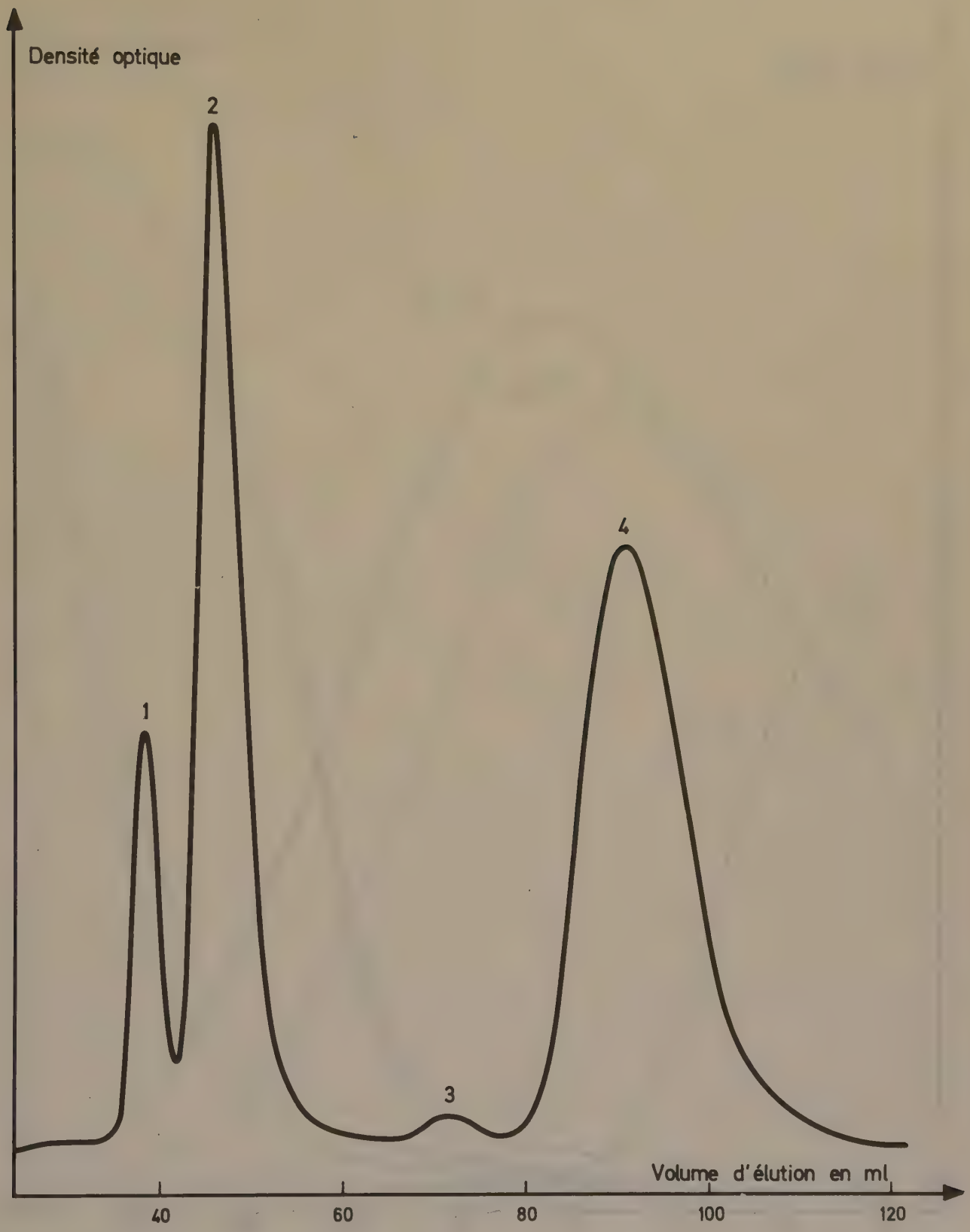


Fig. 51

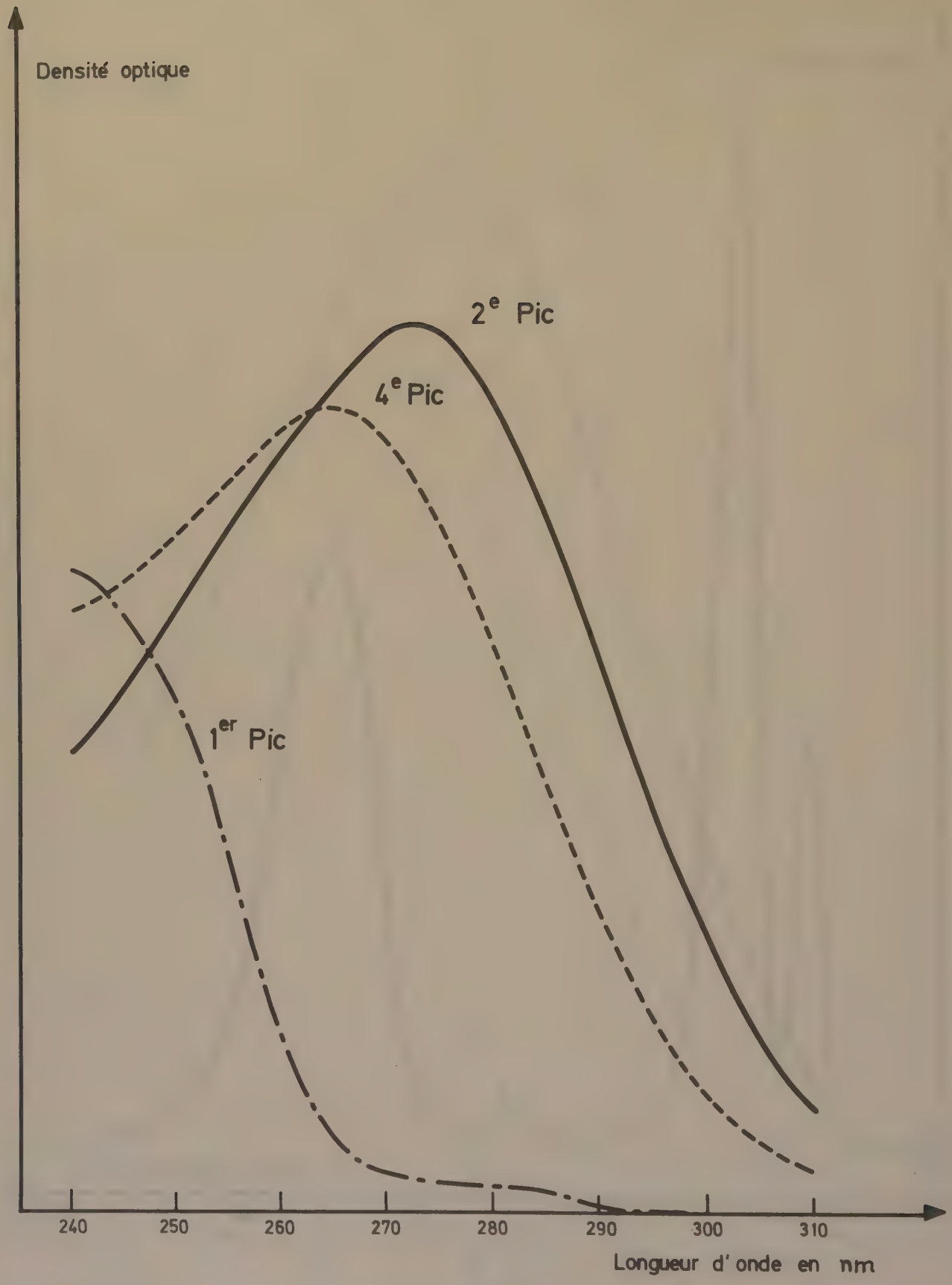

Densité optique
2e Pic
4e Pic
1er Pic
240
250
260
270
280
290
300
310
Longueur d'onde en nm

Fig. 52

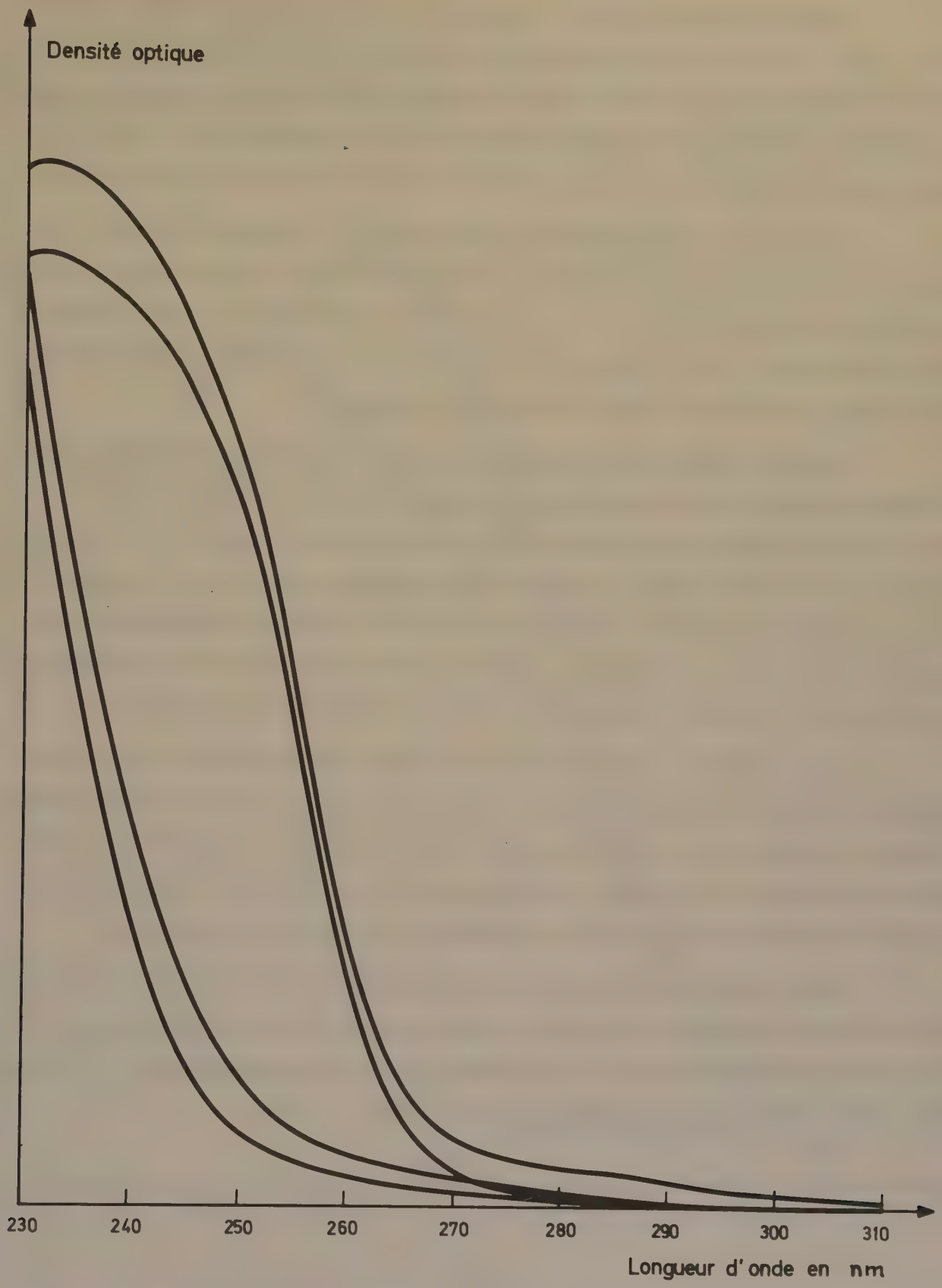

Densité optique
230
240
250
260
270
280
290
300
310
Longueur d'onde en nm

Fig. 53

D'après l'allure générale des spectres fournis par les deux premiers corps élués, et bien qu'ils ne soient pas mentionnés dans la littérature malgré notre abondante documentation, nous émettons l'hypothèse que ces deux corps constituent le mélange de composés découvert par Linsert (105), obtenu également par Westerhof (34) malgré l'emploi d'une température élevée (45°C).

Les spectres ultraviolets des deux derniers isomères élués, à l'état libre, correspondent vraisemblablement aux spectres des suprastérols I et II ; le spectre du suprastérol$_2$I est le seul, à notre connaissance, a être donné dans la littérature (29) ; Windaus (97) fournit les spectres des suprastérols$_2$ I et II, mais sous forme d'ester allophanique seulement.

Durant nos différents essais, nous avons porté toute notre attention à ce qu'aucune partie de la vitamine D_2 ne soit transformée en prévitamine ; nous n'avons jamais observé la présence de ce dernier corps dans les solutions irradiées, malgré l'emploi de colonnes de dimensions 57 cm x 1 cm, remplies avec un mélange de 88 % de Silicagel et 12 % d'Alumine, qui permettent une séparation aisée de la vitamine D_2 et de la prévitamine (fig. 26) ; les spectres ultraviolets de ces deux corps, après élution, sont donnés en figure 54 .

En conclusion, et d'après nos résultats expérimentaux, nous avons montré que nos méthodes d'analyse chromatographique ont permis de mettre en évidence deux nouveaux isomères photochimiques, pour des solutions de vitamine D_2 faiblement irradiées, et quatre isomères, également produits par le rayonnement ultraviolet, pour des solutions plus fortement irradiées.

Nous avons donné le spectre ultraviolet de chacun de ces six isomères, séparés par la chromatographie sur colonne, dont, à notre connaissance, seuls les spectres ultraviolets de la trans-vitamine D_2 et du suprastérol$_2$ I, à l'état libre, étaient fournis par la littérature (29, 106).

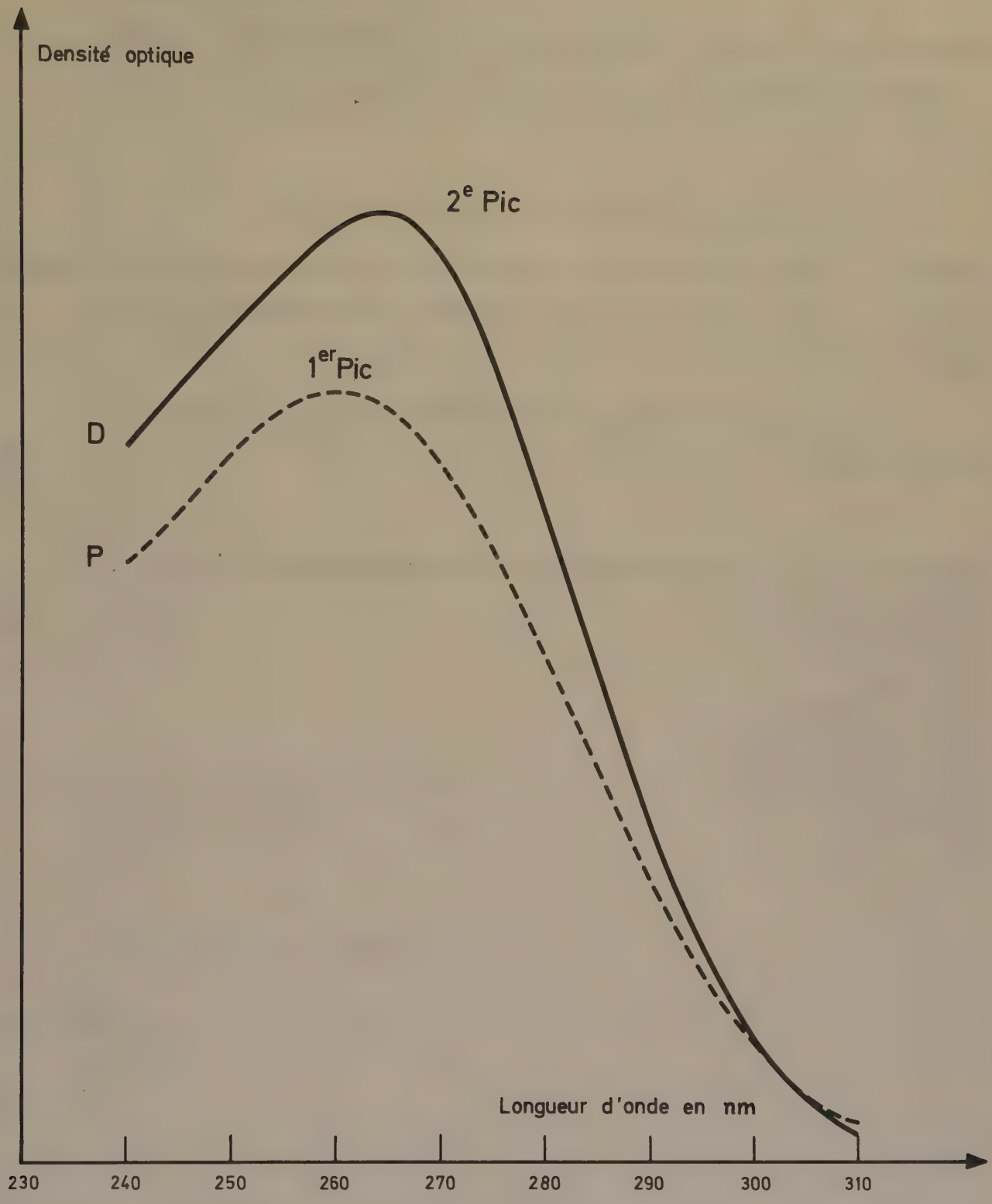

Densité optique
2e Pic
1er Pic
D
P
Longueur d'onde en nm
230
240
250
260
270
280
290
300
310

Fig. 54

ANNEXE 3

PROGRAMME FORTRAN UTILISE DANS LES CALCULS DE LA VALEUR PROPRE MINIMUM λ_m ET DES COMPOSITIONS RELATIVES.

Ce programme comprend trois sous-programmes :

CARMA - lecture des paramètres physiques du système photochimique étudié.

MATRA - calcule les fonctions d'interactions de la matrice $[a]$.

PROPRE - calcule les valeurs propres λ_i et les vecteurs propres.

Il a été exécuté sur la machine IBM 360-91 du Département de l'Informatique, au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

```
VALEURS ET VECTEURS PROPRES DU GRAPHE DE L'ERGOSTEROL.
DOUBLE PRECISION A
DIMENSION A (10,10)
COMMON/NN/N
CONTINUE
CALL CARMA (N)
CALL RPSLDE (FLU)
CALL MATRA (FLU,A)
CALL PROPRE (A)
GOT0900
END
```

```
      SUBROUTINE CARMA (N)
      DIMENSION EPS (10), QU(10, 10), TH (10, 10)
      COMMON/CAR/EPS, QU, TH
      CALLRPSLDI (N)
      DO100I = 1, N
      EPS(I) = 0.
      DO101J=1, N
      QU(I, J) = 0.
      TH(I, J) = 0.
101   CONTINUE
100   CONTINUE
      DO102I=1, N
      CALLRPSLDE (EPS(I) )
102   CONTINUE
      DO107I = 1, N
      DO108  J = 1, N
      CALL RPSLDE (QU(I, J) )
108   CONTINUE
107   CONTINUE
      DO105I=1, N
      DO106  J = 1, N
      CALL RPSLDE(TH(I, J) )
106   CONTINUE
105   CONTINUE
      RETURN
      END


      SUBROUTINE CLASS (N, VP, IM)
      DIMENSION VP (10)
      DOUBLE PRECISION        VP
      Z=VP(1)
      IM = 1
      DO100 J = 2, N
      IF (VP(J).LT.Z) GOT0100
      Z = VP (J)
      IM = J
100   CONTINUE
      RETURN
      END
```

```
      SUBROUTINE MATRA (FLU,A)
      DIMENSION QU (10,10), TH(10,10), F(10,10), EPS(10), A(10,10)
      DOUBLE PRECISION A
      COMMON/CAR/EPS, QU, TH
      COMMON/NN/N
    2 FORMAT (1HO///)
    5 FORMAT (1X, 5 E20.5)
   10 FORMAT (1X, 3 E20.6)
      FK=2.302*1.E-20/6.023
      WRITE(6,10)FK, FLU
      DO 103 I=1, N
      DO 104 J=1, N
      A(I, J)=0.
      F(I, J)=FLU* FK* QU (I, J)*EPS(J) + TH (I, J)
  104 CONTINUE
  103 CONTINUE
      CALL SCOPE (F, 10, 1, N, 1, N, 4)
      WRITE (6, 2)
      DO124 I=1, N
      DO125 J=1, N
      IF(I.EQ. J)GOT0126
      A(I, J)=F(I, J)
      GOTO125
  126 DO127 K=1, N
      A(I,I)=A(I,I)-F(K,I)
  127 CONTINUE
  125 CONTINUE
  124 CONTINUE
      DO 200 I=1, N
      WRITE(6, 5) (A (I, J), J=1, N)
  200 CONTINUE
      RETURN
      END
```

```
      SUBROUTINE PROPRE (AA)
      DIMENSIONA (10,10),AA(10,10),VP(10),VPI(10)
      DIMENSION VECT (10,10), UN(10),VN(10),UNT(10),MAR(10)
      DIMENSION VOP(10), BB(10,10)
      DOUBLE PRECISION A, BB
      DOUBLE PRECISION VECT,VOP,UN,VN,UNT,MAR
      COMMON/NN/N
    2 FORMAT(1HO///)
   10 FORMAT (10X,I4,2E25.8)
   11 FORMAT (1X,5E16.5)
      DO 600 I=1,N
      DO 601 J=1,N
      BB (I,J)=AA(I,J)
  601 CONTINUE
  600 CONTINUE
      CALL DEQR (N,AA,10,VP,VPI)
      WRITE (6,10) (I,VP(I),VPI(I),I=1,N)
      CALL CLASS (N,VP,IM)
      VOP(1)=VP(IM)
      WRITE (6,2)
      WRITE (6,10) IM,VP(IM),VOP(1)
      CALL DEREIN ( A,N,10,1,VECT,VOP,UN,VN,UNT,MAR,BB)
      WRITE (6,2)
      Z=0.
      DO 500 I=1,N
      Z=Z+VECT (1,I)
  500 CONTINUE
      DO 501 I=1,N
      VECT(1,I)=VECT(1,I)/Z
  501 CONTINUE
      WRITE(6,11) (VECT(1,I),I=1,N)
      RETURN
      END
```

BIBLIOGRAPHIE

(1) DELATTRE P. L'Evolution des systèmes moléculaires, Ed. Maloine, 1971.

(2) WINDAUS A., WERDER F. V., LÜTTRINGHAUS A. Ann. der Chem. 499, p. 188, 1932.

(3) VELLUZ L., AIMARD L., PETIT G. Bull. Soc. Chim. Fr. 22, p. 1341, 1955.

(4) HAVINGA E., de KOCK R. J., RAPPOLDT M. P. Tetrah. 11, p. 276, 1960.

(5) KOEVOET A. L., VERLOOP A., HAVINGA E. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 74, p. 788, 1955.

(6) INHOFFEN H. H., BRÜCKNER K., GRÜNDEL R., QUINKEERT G. Chem. Berichte, 87, p. 1407, 1954.

(7) HAVINGA E., KOEVOET A. L., VERLOOP A. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 74, p. 1230, 1955.

(8) RAPPOLDT M. P. Thèse - Université de Leyde, 1958.

(9) SANDERS G. M., HAVINGA E. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 83, p. 665, 1964.

(10) SANDERS G. M. Thèse - Université de Leyde, 1967.

(11) RAPPOLDT M. P., HAVINGA E. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 79, p. 369, 1960.

(12) RAPPOLDT M. P. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 79, P. 392, 1960.

(13) RAPPOLDT M. P. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 79, p. 1012, 1960.

(14) REERINK E. H., VAN WIJK A. Biochem. J. 23, p. 1294, 1929.

(15) RAPPOLDT M. P., WESTERHOF P., HANEWALD K. H., BUISMAN J. A. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 77, p. 241, 1958.

(16) WINDAUS A. Z. Physiol. Chem. 65, p. 110, 1910.

(17) VELLUZ L., AMARD G. C.R. Ac. Sci. Fr. 228, p. 692, 1949.

(18) MULDER F.J., ROBORGH J.R., DE MAN Th. J., KEUNING K.J., HANEWALD K.H. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 76, p. 733, 1956.

(19) NIELD C., RUSSELL W., ZIMMERLI A. J. Biol. Chem. 136, p. 73, 1940.

(20) WINDAUS A., DITHMAR K., FERNHOLZ E. Ann. der Chem. 493, p. 259, 1932.

(21) JONES E., MEAKINS G.D. J. Chem. Soc. p. 1159, 1959 - p. 2054, 1965.

(22) WINDAUS A., LINSERT O., LÜTTRINGHAUS A., WEIDLICH G. Ann. der Chem. 492, p. 231, 1932.

(23) FRASER R.A., DUNCAN W.J., COLLAR A.R. Elementary matrices, Mac Millan, 1947.

(24) NORMANN A.W., DE LUCA H.F. Anal. Chem. Vol. 35, n° 9, p. 1247, 1963.

(25) KOBAYASHI T. Vitamins (Japon), Vol. 34, n° 5, p. 477, 1966.

(26) KOBAYASHI T. The J. of Vitamin. (Japon) Vol. 13, p. 255, 1967.

(27) ZIFFER H., VANDENHEUVEL W.J.A., HAAHTI E.O.A., HORNING E.C. J. of Amer. Chem. Soc. Vol. 82, p. 6411, 1960.

(28) SINGH E.J., GERSHEBEIN L.L. J. of Chromat. Sci. Vol. 8, p. 162, 1970.

(29) SHAW W.H.C., JEFFERIES J.P., HOLT T.E. Analyst, Vol. 82, p. 2, 1957.

(30) BOGOLOVSKI N.A., SHNAIDMAN L.O., KUZNETSOVA E.N. Med. Prom SSSR, Vol. 19, p. 41, 1965.

(31) KOBAYASHI T. Vitamins (Japon), Vol. 34, n° 5, p. 482, 1966.

(32) SHAW W.H.C., JEFFERIES J.P., HOLT T.E. Analyst Vol. 82, p. 8, 1957.

(33) FISCHER G.A., KABARA J.J. Anal. Bioch. Vol. 9, p. 303, 1964.

(34) WESTERHOF P., KEVERLING BUISMAN J.A.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas Vol. 75, p.1243,1956

(35) VELLUZ L., PETIT A., MICHEL G., ROUSSEAU G.
C.R.Ac. Sci.t.226, p. 1287, 1948.

(36) VELLUZ L., PETIT A., AMIARD G.
Bull. Soc. Chim. Fr. Vol. 15, p. 1115, 1948.

(37) VESSMAN J., AHLEN G. Acta Pharmaceutica Suecica, Vol. 1, N° 6, p. 209, 1964.

(38) NAIR P.P., BUCANA C., DE LEON S., TURNER D.
Analyt. Chem. Vol. 37, N° 6, p. 631, 1965.

(39) TRANCHANT J., PREVOT A.F.,
Manuel pratique de Chromatographie en phase gazeuse. Chapitre V. Masson & Cie, 1968.

(40) WOTIZ H.H. Gas chromatography of steroïds in biological fluids, Ed. Lipsett, Plenum Press, p. 301, 1965.

(41) BROOKS C.J.W. Anal. Chem. Vol. 37, p. 636, 1965.

(42) ARNOLD J.E., FALES H.M.
J. of Gas Chrom. Vol. 3 p. 131, 1965.

(43) WOLINSKY J., BAXTER L.L., HAMSHER J.
The J. of Organic Chem. Vol. 33, N° 1, p. 438, 1968.

(44) TANRET C. Ann. Chim. Phys. Vol. 8, N° 15, p. 314, 1908.

(45) WINDAUS A., GROSSKOPF W.
Z. Physiol. Chem. Vol. 124, p. 8, 1922.

(46) BILLS C.E., COX W.M. J. Biol. Chem. Vol. 84, p. 455, 1929.

(47) BILLS C.E., HONEYWELL E.M. J. Biol. Chem. Vol. 80, p. 15, 1928.

(48) BILLS C.E., MAC DONALD F.G. J. Biol. Chem. Vol. 88, p. 337, 1930.

(49) CALLOW R.K. Biochem. J. Vol. 25, p. 79, 1931.

(50) SHAW W.H.C., JEFFERIES J.P.
Analyst, Vol. 78, n° 930, p 509, 1953.

(51) MORTON R.A., HEILBRON I.M., KAMM E.D.
J. Chem. Soc. p. 2000, 1927.

(52) MORTON R.A., DE GOUVEIA A.J.A.
J. Chem. Soc. p. 911, 1934.

(53) HOGNESS T.R., SIDWELL A.E., ZSCHEILE F.P.
J. Biol. Chem. Vol. 120, p. 239, 1937.

(54) HUBER W., EWING G.W., KRIGER J.
J. Amer. Chem. Soc. Vol. 67, p. 609, 1945.

(55) LAMB F.W., MUELLER A., BEACH G.W.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed Vol. 18, p. 187, 1946.

(56) CALLOW R.K. C hem. Ind. Vol. 49, p. 991, 1930.

(57) CALLOW R.K. Biochem. J. Vol. 25, p. 87, 1931.

(58) BERGMANN W. J. Biol. Chem. Vol. 132, p. 471, 1940.

(59) HASLAM R.M., KLYNE W.
Biochem. J. Vol. 55, p. 341, 1953.

(60) KLYNE W. La chimie des stéroïdes, Gauthier-Villars, 1966.

(61) LATARJET R., MORENNE P., BERGER R.
Extrait des Annales de l'Institut Pasteur,
Tome 85, p. 174, 1953.

(62) BEESE N.C. J. Opt. Soc. Amer. Vol. 29, p. 278, 1939.

(63) DIXON R.N. Spectroscopy & Structure. Ed. Methuen,
Londres, 1964.

(64) LEIGHTON W.G., FORBES G.S.
J. Am. Chem. Soc. Vol. 52, p. 3139, 1930.

(65) FORBES G.S., HEIDT L.J.
J. Am. Chem. Soc. Vol. 56, p. 2363, 1934.

(66) PARKER C.A. Proc. Roy. Soc. A. Vol. 220, p. 104, 1953.

(67) BAXENDALE J.H., BRIDGE N.K.
J. Phys. Chem. Vol. 59, p. 783, 1955.

(68) PARKER C.A. Trans. Faraday Soc. Vol. 50, p. 1213, 1954.

(69) PITTS J.N., MARGERUM J.D., TAYLOR R.P., BRIM W.
J. Am. Chem. Soc. Vol. 77, p. 5499, 1955.

(70) HATCHARD C.G., PARKER C.A.
Proc. of the Royal Soc. Vol. A 235, p. 518, 1956.

(71) MOUSSERON-CANET M., MANI J.C.
Photochimie et réactions moléculaires, Dunod, 1969.

(72) CALVERT J.G., PITTS J.N.
Photochemistry, John Wiley, 1966.

(73) SCHOLLER, R., JAYLE M.F. Chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes.hormonaux: Dunod, 1967.

(74) SZYMANSKI H.A. (Ed.) Biomedical applications of gas chromatography. Vol. 1 et 2, Plenum Press, 1964.

(75) KUKSIS A. dans Methods of Biochemical analysis Vol. 14 (Ed. D. Glick), Interscience Publishers.

(76) WOTIZ H.H., CLARK S.J.
Gaz chromatography in the analysis of stéroïd hormones, Plenum Press, 1966.

(77) WHITTIER M.B., MIKKELSEN L., SPENCER S.
Technical paper n° 13, F & M Scientific Corporation.

(78) KABOT F.J., ETTRE L.S.
J. of Gas Chrom., p. 21, Janvier 1964.

(79) R.W.R. BAKER, GOVER D.B.,
Nature, Vol. 192, p. 1074, 1961.

(80) LUUKKAINEN T., VANDENHEUVEL W.J.A., HAAHTI E.O.A., HORNING E.C. Biochim.Biophys. Acta Vol. 52, p. 599, 1961.

(81) VANDENHEUVEL W.J.A., SWEELEY C.C., HORNING E.C.
J. Am. Chem. Soc. Vol. 82, p.3481, 1960.

(82) FELDMAN G.L., KUCK J.F.R.
Lipids, vol. 1, p. 158, 1966.

(83) HORNING E.C., BROOKS C.J.W., JOHNSON L., GARDINER W.L.
Separation Science, Vol. 1; p.555, 1966.

(84) BEERTHUIS R.K., RECOURT J.H.
Nature, Vol. 186, p. 372, 1960.

(85) AVIOLI L.V., LEE S.W. Analytical Biochemistry, Vol. 16, p.193,1966.

(86) D'HOLLANDER F., CHEVALLIER F.
Biochim. & Biophys. Acta, Vol. 176, p.146, 1969.

(87) DEHENNIN L., SCHOLLER R.
J. of Stéroïd Biochem. Vol. 1, p. 57, 1969.

(88) KROMAN H.S., BENDER S.R.(Ed.)
Theory and Application of Gas Chromatography in Industry and Medicine. Grune & Statton, 1968.

(89) VELLUZ L. Conférence faite le 24 Avril 1959 à l'Université de Leyde.

(90) VELLUZ L., AMIARD G. Bull. Soc. Chim. Fr. p. 205, 1955.

(91) KOEVOËT A.L. Thèse - Université de Leyde, 1956.

(92) PIRLOT G. Anal. Chim. Acta, Vol. 2, p. 744, 1948.

(93) MORRIS W.W., WILKIE J.B., JONES S.W., FRIEDMAN L.
Anal. Chem. Vol. 34, n° 3, p. 381, 1962.

(94) HORNING E.C., MADDOCK K.C., ANTHONY K.V., VANDENHEUVEL W.J.A. Anal. Chem. Vol. 35, n° 4, p. 526, 1963.

(95) LAU H.L. J. of gas Chrom. p. 136, Avr. 1966.

(96) MERMET-BOUVIER R. Bull. Soc.Chim. Fr. N° 8-9, p. 3174, 1970.

(97) WINDAUS A., GAEDE J., KÖSER J. & STEIN G.
Ann. Chem. Vol. 483, p. 17, 1930.

(98) MERMET-BOUVIER, R., NAUDET G.
Bull. Soc. Chim. Fr. N° 6, p. 2367, 1970.

(99) RODD E.H. (Ed.) Chemistry of Carbon Compounds, Vol. II, Part B, p. 852, 1953. Elsevier Publ.

(100) DEUEL H.J. (Ed.) The Lipids, Vol. 1, 1951. Interscience Publ.

(101) SWEELEY C., BENTLEY R., MAKITA M. & WELLS W.
J. Amer. Chem. Soc. Vol. 85, p.2497,1963.

(102) GREEN J. Biochem. J. Vol. 49, p. 232, 1951.

(103) LAQUER F., LINSERT O. Klin. Wochschr. Vol. 12, p. 753, 1933.

(104) SETZ P. Z. Physiol. Chem. Vol. 215, p. 183, 1933.

(105) LINSERT O. Chem. Abstr. Vol. 30, p. 2326, 1936.

(106) VERLOOP A., KOEVOËT A.L., HAVINGA E.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas Vol. 74, p. 1125, 1955.

(107) VERLOOP A., KOEVOËT A.L., VAN MOORSELAAR R., HAVINGA E.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas Vol. 78, p. 1004, 1959.

(108) SEBRELL W.H., HARRIS R.S. (Ed.)
The Vitamins, Vol. III, seconde édition.
Academic Press, N.Y. 1971.

(109) FIESER L.F., FIESER M. Stéroïds. Reinhold Publishing Company, N.Y. 1959.

(110) ABILLON E. Systèmes linéaires. DB/GEERSM N°6
CEN. Saclay, Mars 1972.

(111) MERMET-BOUVIER R. J. of Chromatography, Vol. 59, p. 226, 1971.

Manuscrit reçu le 25 septembre 1972

Vu et Permis d'Imprimer N° 101B
RENNES, le 16 juin 1972
Le Président de l'Université de Rennes,

C. CHAMPAUD

Vu et approuvé
RENNES, le 25 mai 1972
Le Directeur de l'U.E.R.

D. GRANDJEAN